



Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Física  
Departamento de Física Aplicada

# **BIOSENSORES ÓPTICOS DE ALTA SENSIBILIDAD BASADOS EN TÉCNICAS DE MODULACIÓN PLASMÓNICA**

*Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Física por:*

**David Regatos Gómez**

*Tesis dirigida por:*

**Dr. Borja Sepúlveda Martínez  
Prof. Gaspar Armelles Reig  
Prof. Laura M. Lechuga Gómez**

*Tutor:*

**Prof. Vicente Moreno De las Cuevas**

**febrero de 2012**

**Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2)  
Consejo Superior de Investigaciones Científica (CSIC)  
Bellaterra (Barcelona)**



La Prof. Laura M. Lechuga Gómez, el Dr. Borja Sepúlveda Martínez, ambos pertenecientes al *Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología* del CSIC, y el Prof. Gaspar Armelles Reig del *Instituto de Microelectrónica de Madrid* del CSIC, como directores, y Vicente Moreno De las Cuevas, CAT-EU del Área de Óptica del Dpto. de Física Aplicada de la Universidad de Santiago de Compostela, como tutor:

### **CERTIFICAN QUE**

El trabajo titulado “Biosensores ópticos de alta sensibilidad basados en técnicas de modulación plasmónica”, realizado por David Regatos Gómez en el *Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas* del Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología del CSIC, ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctor en Física.

Fdo.: Borja Sepúlveda Martínez

Fdo.: Laura M. Lechuga Gómez

Fdo.: Gaspar Armelles Reig

Fdo.: Vicente Moreno de las Cuevas

En Santiago de Compostela, 23 de febrero de 2012

Fdo.: David Regatos Gómez





*A mis padres  
y a todos los que me han ayudado  
a llegar hasta aquí*



# RESUMEN

En esta memoria de tesis doctoral se presenta el análisis, desarrollo y optimización de dos dispositivos biosensores, conceptualmente planteados y patentados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral. Ambos dispositivos, catalogados como biosensores ópticos, basan su principio de funcionamiento en dos diferentes técnicas de modulación plasmónicas.

El primero de ellos, el biosensor MOSPR, está basado en la modulación magneto-óptica del plasmón superficial generada en transductores magneto-plasmónicos; es decir, en estructuras plasmónicas con actividad magneto-óptica. Estudios preliminares, realizados en 2006, demostraron que este tipo de sensor posee una sensibilidad superior a la mostrada por un sensor convencional de resonancia de plasmón. Durante esta tesis, se ha proseguido con el análisis y desarrollo de este sensor, centrando nuestro trabajo en el estudio y optimización de las estructuras magneto-plasmónicas empleados como transductor del biosensor MOSPR, y en el análisis de la dependencia espectral de su respuesta sensora. El segundo dispositivo evaluado, el biosensor  $\pi$ MSPR, se presenta por primera vez en esta memoria de tesis doctoral. De esta forma, el análisis llevado a cabo sobre este sensor se focaliza principalmente en la evaluación de la novedosa técnica de modulación plasmónica desarrollada, la modulación en longitud de onda del plasmón superficial; así como en el análisis, fabricación, optimización, y caracterización experimental del dispositivo sensor y de su transductor. La técnica de modulación implementada basa su principio de funcionamiento en la dependencia espectral de la permitividad dieléctrica de los metales.

El trabajo realizado durante esta tesis abarca desde los conceptos fundamentales de las técnicas de modulación empleadas hasta los aspectos más técnicos del desarrollo y fabricación de los dispositivos. Durante el mismo, se han desarrollado programas de cálculo que permiten simular y optimizar la respuesta sensora de los sensores plasmónicos-modulados. Igualmente importante ha sido la caracterización experimental y optimización llevadas a cabo de los prototipos fabricados. Finalmente, una comparativa entre los dispositivos desarrollados y el sensor plasmónico convencional demuestra que, si las estructuras empleadas como transductores de los sensores plasmónicos modulados son convenientemente optimizadas, la sensibilidad de estos sensores respecto al sensor de resonancia de plasmón convencional, es claramente superior. Los resultados obtenidos, y el hecho de que el incremento de sensibilidad observado puede aumentarse aún más aplicando diversas mejoras en los sistemas experimentales empleados, permiten afirmar que los sensores analizados y desarrollados durante esta tesis son una seria alternativa de futuro dentro del campo de los sensores ópticos.



# AGRADECIMIENTOS

Llegado el final de esta tesis, y tras echar la vista atrás, considero injusto que mi nombre sea el único que figure en la portada de esta memoria. Son muchas las personas que han hecho posible que yo esté hoy aquí escribiendo estas líneas. Unas con su trabajo y esfuerzo, otras con su apoyo y cariño. Unas conscientemente, otras sin saberlo. Y todas ellas, sin haber pedido nada a cambio y sin haber cejado nunca en su empeño.

Sin duda, yo no estaría hoy aquí si mis padres no hubieran dedicado su vida a sus hijos. No estaría hoy aquí sin el apoyo y ejemplo de mis hermanos. Y no estaría hoy aquí sin TODO lo que me da Rebeca. Ellos son mi vida, y son lo más valioso que tengo.

Esta tesis no habría sido posible sin la “Divina Trinidad” que forman mis directores de tesis. Sin su guía, consejos, experiencia, apoyo... jamás habría alcanzado esta meta. Como le escuché decir una vez a P.M. Echenique: "Sólo hay una forma de aprender a hacer ciencia, hacerla junto a los que la hacen bien". Laura no sólo me dio la oportunidad de hacer una tesis, sino que me dejó pensar, decidir y equivocarme (la única forma de aprender de verdad), y siempre aportó un punto de vista diferente. Gaspar fue el faro del siempre difícil primer año de tesis. Ese en el que un recién licenciado deambula por un laboratorio sin comprender nada. A pesar de la distancia, siempre ha estado ahí para dar su ayuda y valiosísima opinión. La infinita creatividad y capacidad de trabajo de Borja no sólo me ha sacado de mil y un laberintos, si no que me ha demostrado que hay gente que tiene un don natural para la *Investigación*. Ha sido un auténtico placer verte en acción.

En esta tesis, el tutor de la misma no ha sido ni mucho menos una figura irrelevante. Vicente es el máximo culpable de que yo haya hecho una tesis doctoral, al haberme metido el gusanillo de la investigación. No sé si algún día te lo podré perdonar... ;)

Todo esto arrancó en un laboratorio del área de Óptica de la Facultad de Física, donde Ana me instruyó en el noble arte de la limpieza de lentes y donde comprendí que McGyver aprendió todo lo que sabía durante su doctorado :D De ahí a Madrid, al IMM. Allí pasé un año. Esa toma de contacto con el mundo predoctoral. Una etapa que recuerdo con mucho cariño y en la que conocí a gente de las que aprendí muchas cosas y que marcan para siempre, como: Ana Calle, Juan B., Antonio, Alfonso, etc. Y sobre todo, una etapa de reencuentro con viejos y muy buenos amigos de la Facultad (Manuela, el Grondo, Elias, Dani, María, Gabi, Sara, Martín, Fran, etc), y con nuevas y grandes amistades (el ClanAstur, El Maki, etc) que hicieron la vida en Madrid mucho más agradable y entretenida. Siguiendo parada Barcelona...

El grupo de Investigación en el que he realizado esta tesis no es bueno, es el mejor. En estos años he aprendido algunas cosas de plasmónica, magneto-plasmónica y de biosensores. Pero he aprendido muchísimas más de unos locos que viven encerrados entre cuatro paredes de ladrillos de la UAB. Hacer esta tesis siempre habrá merecido la pena por el hecho de haberles conocido. Que puedo decir de D. Fariña, creador de todo hardware y padre de todo “mi” software, y de M.A. Otte, compañero de mil batallas plasmónicas y no-plasmónicas. Son tantos los buenos momentos vividos en el Centro del Universo [junto a Montse] y en el extrarradio, que no sabría por donde empezar. Por encima de todo, echaré muchísimo de menos el tallat + Muffin + conversación de las tardes. Espero volver a trabajar con vosotros un día no muy lejano ;) A las chicas (MC, Ana, Mar, Steeeeeefi, Laurita, Silvia, Daphne, María), a los nuevos (César, Sam, Braulio) y a los que se han ido (Juan, Ester, Orli, Elena, Laura F.), gracias a todos por mil y una risas, ayuda, consejos y muchos muchos favores. Con vosotros todo ha sido mucho más fácil y divertido, aunque eso me haya costado rebajar en unos años mi esperanza de vida jejeje

Las que hubiera liado si no llega a ser por Xaviz del cinROS y el pelotudo de Rosario. Ellos siempre al rescate, y yo siempre eternamente agradecido... A la gente del CM3 (German, María José, Marius, Ingmar, etc.) que se ha peleado todos los días para que eso que algunos llaman evaporadora, lo sea de verdad.

La cuadrilla. Esa otra familia que todo vasco posee. Esa que siempre está en lo bueno y en lo malo, y de la que uno presume con orgullo. Como también presumo de gente como Paula, Javi, Belén y Manuel. A todos ellos se les echa mucho de menos, y aunque piensen que no han contribuido a esta tesis, lo han hecho de forma decisiva.

Seguro que me olvido de alguien. Mil perdones por adelantado.

Finalmente, agradecer al Gobierno Vasco la financiación de esta tesis doctoral a través del Programa de Formación de Investigadores. Un programa de becas que debería ser ejemplo para el resto de Comunidades Autónomas. Gracias por apostar por la ciencia, por entender que es importante, y por ser conscientes de que los que la hacen, no buscan hacerse ricos, pero también necesitan comer.

---

*“Tu tiempo es limitado, de modo que no lo malgastes viviendo la vida de alguien distinto. No quedes atrapado en el dogma, que es vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las opiniones de los demás acallen tu propia voz interior. Y, lo que es más importante, ten el coraje para hacer lo que te dicen tu corazón y tu intuición. Ellos ya saben de algún modo en qué quieres convertirte realmente. Todo lo demás es secundario.”*

Steve Jobs

# LISTA DE PUBLICACIONES Y PATENTES

## Publicaciones

1. D. Regatos, A. Calle, D. Fariña, A. Cebollada, G. Armelles, B. Sepúlveda and L. M. Lechuga. “Magneto-Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor (MOSPR)”. **Proceeding of IBERSENSOR’2008 (6th Ibero-American Conference on Sensors. 2008).**
2. Sepúlveda, L.G. Carrascosa, D. Regatos, M.A. Otte, D. Fariña and L.M. Lechuga. “Surface Plasmon Resonance Biosensors for Highly Sensitive Detection in Real Samples”. **Proceeding of SPIE, 7397, 73970Y1-73970Y11 (2009).**
3. D. Regatos, D. Fariña, A. Calle, A. Cebollada, B. Sepúlveda, G. Armelles and L.M. Lechuga, “Au/Fe/Au multilayer transducers for Magneto-Optic Surface Plasmon Resonance sensing”. **J. Applied Physics, Vol. 108, 054502 (2010).**
4. D. Regatos, B. Sepúlveda, D. Fariña, L. G. Carrascosa, and L. M. Lechuga. “Suitable combination of noble/ferromagnetic metal multilayers for enhanced magneto-plasmonic biosensing”. **Optics Express 19, 8336-8346 (2011)**<sup>1</sup>.
5. M.A. Otte, , M.C. Estévez, D. Regatos, L. M. Lechuga and B. Sepúlveda. “Guiding light in monolayers of sparse and random plasmonic meta-atoms”. **ACS nano 5 (11), 9179–9186 (2011).**
6. D. Regatos, B. Sepúlveda, D. Fariña and L. M. Lechuga. “A novel plasmonic modulation technique for SPR sensitivity enhancement”. **[En preparación].**

## Patentes

Título: “MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE UN MEDIO DIELECTRICO ADYACENTE A UN MEDIO PLASMÓNICO Y DISPOSITIVO CORRESPONDIENTE”.

Inventores: Borja Sepúlveda, David Regatos, Gaspar Armelles, Laura M. Lechuga y David Fariña.

Número de solicitud: P201030166 (PCT/ES2011/070085).

País y fecha de prioridad: España, 10 Febrero 2010.

Entidad titular: CSIC y CIBER-BBN

---

<sup>1</sup> Artículo seleccionado para ser incluido en el *Virtual Journal for Biomedical Optics (VJBO)* Issue 5, June 1 (2011).





# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
LISTA DE PUBLICACIONES Y PATENTES.....	XI
ÍNDICE GENERAL .....	XIII
MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS .....	1
ESQUEMA DE LA MEMORIA .....	3
CAPÍTULO 1    BIOSENSORES .....	5
1.1. Definición.....	6
1.2. Características y propiedades.....	6
1.3. Aplicaciones .....	8
1.4. Tipos de biosensores .....	8
CAPÍTULO 2    RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL.....	15
2.1. Teoría electromagnética de plasmones superficiales .....	16
2.1.1. Modos guiados .....	17
2.1.2. Modos plasmónicos .....	20
2.1.3. Vector de ondas del plasmón superficial .....	22
2.1.4. Distribución transversal de campo electromagnético del plasmón superficial.....	24
2.1.5. Distancia de penetración.....	25
2.1.6. Distancia de propagación del plasmón superficial.....	26
2.1.7. Efecto de la rugosidad superficial .....	27
2.2. Plasmones superficiales en sistemas de multicapas .....	28
2.2.1. Estructura simétrica .....	28
2.2.2. Estructura asimétrica .....	29
2.3. Métodos de excitación.....	30

2.3.1. Excitación mediante reflexión interna total frustrada .....	32
2.3.2. Excitación mediante red de difracción .....	34
2.3.3. Excitación mediante luz guiada .....	35
<b>CAPÍTULO 3 ANÁLISIS DEL BIOSENSOR SPR .....</b>	<b>37</b>
3.1. Principio de funcionamiento .....	38
3.1.1. Ángulo y longitud de onda de excitación .....	39
3.1.2. Variación del índice de refracción del medio dieléctrico .....	41
3.1.2.1. Cambio de índice de refracción volumétrico .....	42
3.1.2.2. Cambio de índice de refracción superficial .....	44
3.1.3. Variación de la condición de excitación del plasmón superficial .....	45
3.2. Biosensor SPR .....	45
3.2.1. Transductor plasmónico .....	46
3.2.2. Receptor biológico .....	47
3.3. Tipos principales de detección en biosensores SPR .....	48
3.3.1. Biosensor SPR-angular .....	49
3.3.2. Biosensor SPR-espectral .....	50
3.3.3. Biosensor SPR de intensidad .....	50
3.4. Reflectancia en configuración de Kretschmann. Espesor óptimo .....	51
3.5. Sensibilidad del biosensor SPR .....	54
3.6. Respuesta sensora .....	57
3.7. Conclusiones .....	58
<b>CAPÍTULO 4 MODULACIÓN PLASMÓNICA .....</b>	<b>59</b>
4.1. Técnicas de aumento de sensibilidad .....	60
4.1.1. Modificación de las propiedades físicas del plasmón superficial .....	61
4.1.2. Desarrollo de nuevas técnicas sensoras basadas en plasmones superficiales .....	61
4.1.2.1. SPR-interferométricos .....	61
4.1.2.2. SPR-modulados .....	62
4.2. La modulación plasmónica como técnica sensora .....	63
4.2.1. Principio de funcionamiento .....	63
4.2.2. Modulación de la reflectancia en configuración Kretschmann .....	64

4.2.3. Técnica de medición.....	66
<b>CAPÍTULO 5 BIOSENSOR MOSPR .....</b>	<b>69</b>
5.1. Modulación magneto-óptica del plasmón superficial .....	70
5.1.1. Efectos magneto-ópticos.....	70
5.1.2. Efectos magneto-plasmónicos .....	73
5.2. Diseño y fabricación del sensor MOSPR.....	75
5.2.1. Transductor magneto-plasmónico .....	76
5.2.2. Actuador magnético .....	78
5.2.3. Sistema óptico de detección .....	79
5.2.4. Sistema de flujo .....	80
5.2.5. Sistema de adquisición y procesamiento de señal .....	82
5.2.6. Sistema de control y visualización de datos .....	83
5.2.7. Montaje experimental preliminar.....	84
5.3. Análisis y optimización de la sensibilidad.....	87
5.3.1. Propiedades magneto-plasmónicas de tricapas Au/Fe/Au .	88
5.3.2. Estudio teórico/experimental de la sensibilidad de estructuras de multicapas Au/Co .....	94
5.3.2.1. Análisis teórico .....	95
5.3.2.2. Verificación experimental .....	98
5.3.3. Sensibilidad en función de la longitud de onda .....	100
5.4. Caracterización experimental. Límite de detección.....	106
5.5. Optimización del sistema experimental .....	108
5.6. Comparativa biosensora. MOSPR vs. SPR.....	110
5.7. Conclusiones .....	114
<b>CAPÍTULO 6 BIOSENSOR <math>\lambda</math>MSPR.....</b>	<b>117</b>
6.1. Modulación en longitud de onda del plasmón superficial .....	118
6.2. Diseño del sensor $\lambda$ MSPR.....	120
6.3. Análisis teórico .....	124
6.3.1. Curvas angulares.....	124
6.3.2. Sensibilidad en función de la longitud de onda .....	128
6.4. Montaje experimental preliminar .....	130
6.5. Análisis y desarrollo experimental .....	132
6.5.1. Fuente de luz .....	132

---

6.5.1.1. Láser de estructura heterogénea .....	133
6.5.1.2. Láser retroalimentado distribuido (DFB) .....	134
6.5.2. Sistema óptico de detección .....	136
6.5.3. Optimización del sistema experimental.....	138
6.5.4. Transductor. Aspectos fundamentales .....	140
6.6. Comparativa experimental. SPR vs. $\lambda$ MSPR.....	143
6.7. Conclusiones.....	146
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES GENERALES .....	149
7.1. Conclusiones.....	149
7.2. Perspectivas futuras.....	150
APÉNDICES .....	153
A. CONSTANTES DIELECTRICAS .....	153
B. MÉTODO DE MATRICES DE TRANSFERENCIA .....	157
C. EJEMPLO DE SENSOGRAMA DEL BIOSENSOR SPR .....	161
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS PRINCIPALES .....	165
LISTA DE FIGURAS .....	169
LISTA DE TABLAS .....	177
BIBLIOGRAFÍA .....	179

# MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

Gracias a su simplicidad, sensibilidad, selectividad y bajo coste, los biosensores ópticos basados en el principio de campo evanescente, y en especial los biosensores de resonancia de plasmón superficial (o comúnmente llamados, biosensores SPR), se han convertido en herramientas esenciales para el análisis en tiempo real y de manera directa de sustancias químicas y biológicas. Esto ha propiciado que, durante las dos últimas décadas, diferentes biosensores SPR hayan sido comercializados por más de veinte compañías a lo largo de todo el mundo. Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad de estos dispositivos, esta no resulta suficiente para la detección directa de bajas concentraciones de analitos de pequeño peso molecular. Por esta razón, el desarrollo de técnicas físicas capaces de aumentar la sensibilidad del sensor SPR, manteniendo a la vez todas sus ventajas, constituye un enorme y atractivo reto.

Dentro de las numerosas técnicas de incremento de sensibilidad publicadas hasta ahora, la basada en la modulación magneto-óptica del plasmón superficial ocupa un prometedor lugar. Esta técnica ya ha demostrado ser capaz de, manteniendo las cualidades que lo caracterizan, aumentar la sensibilidad del biosensor SPR convencional. Por esto motivo, resulta de suma importancia continuar los estudios preliminares y profundizar en este tipo de técnica sensora. En el presente trabajo se prosigue esta línea de investigación, focalizando el estudio en el análisis y optimización de la capacidad sensora de los dispositivos plasmónicos modulados magneto-ópticamente. Además de esto último, en esta memoria también se presenta y desarrolla un novedoso dispositivo biosensor de modulación plasmónica, basado en la dependencia del plasmón superficial con la longitud de onda, cuya patente se encuentra en proceso de tramitación [1].

Los **objetivos principales** de esta tesis son:

1. Análisis teórico/experimental de técnicas de modulación plasmónica. Más concretamente, la optimización de la capacidad sensora de la modulación magneto-plasmónica y el estudio de una novedosa técnica de modulación, denominada *modulación en longitud de onda del plasmón superficial*.
2. Desarrollo, fabricación y optimización de dispositivos biosensores basados en las técnicas de modulación evaluadas en el punto anterior.



# ESQUEMA DE LA MEMORIA

Este manuscrito está dividido en ocho capítulos, cuyo contenido se resume a continuación:

- **Capítulo 1** – En este capítulo se define lo que es un dispositivo biosensor, explicando además su principio de funcionamiento y enumerándose las ventajas e inconvenientes de estos dispositivos respecto a las técnicas analíticas convencionales, así como sus principales aplicaciones. Finalmente, tras clasificar los diferentes tipos de biosensores, se presenta una tabla comparativa entre los distintos tipos de biosensores ópticos de campo evanescente.
- **Capítulo 2** – Al tratarse de un trabajo focalizado en la optimización de sensores plasmónicos, resulta imprescindible conocer y entender en profundidad el fenómeno electromagnético denominado *plasmón superficial*. En este capítulo se definen, describen y analizan los plasmones superficiales generados en una única interfase metal/dieléctrico, así como los generados en capas metálicas delgadas. También se presentan las principales técnicas de excitación de plasmones superficiales empleadas en los sensores plasmónicos.
- **Capítulo 3** – En este capítulo se explica el principio de funcionamiento y aspectos fundamentales del biosensor SPR, así como los tipos principales de configuraciones que existen. A continuación, gracias a los programas de cálculo desarrollados durante esta tesis doctoral, se realiza un estudio teórico de la sensibilidad asociada a cada uno de los tipos de sensores de SPR en función de la longitud de onda y/o el ángulo de incidencia. Asimismo, también se introduce el concepto de *Respuesta sensora*.
- **Capítulo 4** – En este capítulo, se introduce el concepto de modulación plasmónica. El capítulo comienza con una introducción de las diferentes estrategias de aumento de sensibilidad del biosensor SPR empleadas hasta ahora. Seguidamente se explica el principio de funcionamiento, consecuencias y capacidad de detección de la modulación plasmónica del plasmón superficial.
- **Capítulo 5 y 6** – En los capítulos 5 y 6 se describen, respectivamente, el principio de funcionamiento, diseño, análisis, desarrollo y optimización de un sensor magneto-óptico de resonancia de plasmón superficial (MOSPR) y de un sensor de resonancia de plasmón superficial modulado en longitud de onda ( $\lambda$ MSPR). En ambos casos se analiza, tanto desde un punto de vista teórico como experimental la sensibilidad de ambos dispositivos y se realiza una comparación directa entre la sensibilidad de los biosensores SPR-modulados y un biosensor SPR de intensidad.

- **Capítulo 7** – En el capítulo final, se presentan las conclusiones más importantes alcanzadas durante el desarrollo de este trabajo, así como las posibles líneas futuras de evolución.

De esta forma, estos ocho capítulos pueden ser agrupados en 4 bloques, siguiendo la estructura indicada más abajo. Así, se tiene:

- Un primer bloque introductorio, formado por el capítulo 1.
- Un segundo bloque teórico, formado por los capítulos 2 y 4, en el que se analizan en detalle los conceptos fundamentales de esta tesis.
- Un tercer bloque de análisis teórico y experimental, formado por los capítulos 3, 5 y 6, en el cual se desarrollan y caracterizan los tres tipos diferentes de sensores plasmónicos estudiados durante esta tesis.
- Finalmente, un cuarto bloque, formado por el capítulo 7, en el que se aglutinan las conclusiones alcanzadas durante esta trabajo de tesis doctoral.

Además de los ocho capítulos descritos anteriormente, la presente memoria de tesis doctoral incluye tres apéndices, además de una relación de los símbolos y abreviaturas empleadas, de las figuras y de las tablas. Finalmente la bibliografía empleada puede encontrarse al final de la memoria.



# Capítulo 1

## BIOSENSORES

*"No importa que uno se caiga,  
siempre y cuando recoja algo del suelo al levantarse."*

*OBSERVACIÓN DE AVERY*

---

Los cinco sentidos clásicos (oído, vista, olfato, gusto y tacto) unidos a los más recientemente establecidos (equilibriocepción, termocepción, nocicepción y propiocepción) son los medios propios con los que cuenta el ser humano para percibir el mundo que le rodea. A pesar de su extraordinaria capacidad, estos sentidos resultan insuficientes para percibir todo lo que ocurre a nuestro alrededor. Como ejemplo, basta decir que nuestro ojo, a pesar de poseer una capacidad de respuesta y de adaptación enormes, no es capaz de percibir ni una décima parte del espectro electromagnético. Lejos de frenar la innata curiosidad del ser humano por conocer y entender el universo en el que vive, estas limitaciones no hacen sino impulsar el desarrollo de dispositivos capaces de percibir y cuantificar lo que escapa a nuestros sentidos. De esta forma, se puede afirmar que un sensor no es otra cosa que un dispositivo capaz de transformar una variable química o física en una señal medible por nuestros sentidos.

A día de hoy resulta imposible precisar el número de dispositivos sensores desarrollados por el ser humano, pudiendo estos presentar desde la sencillez de un termómetro hasta la complejidad de un detector de partículas subatómicas. Es tal el grado de integración de los sensores en nuestro vida diaria que, prácticamente no somos conscientes de hasta qué punto estamos rodeados por estos dispositivos. Por ejemplo, hoy en día, elementos tan comunes como electrodomésticos, automóviles o *smartphones*, poseen decenas de sensores distintos. Pero además de facilitar nuestro día a día, los sensores se han convertido en elementos indispensables en áreas tan diversas como la industria, el diagnóstico médico, la seguridad y el control medioambiental. Gracias a ellos es posible controlar y optimizar los procesos industriales, monitorizar las constantes vitales de los enfermos o detectar la presencia de explosivos. Sin embargo, es en el campo de la investigación científica

donde los sensores alcanzan una mayor relevancia, debido a la estrecha relación que existe entre el desarrollo tecnológico de este tipo de dispositivos y el avance del conocimiento científico. Así, el desarrollo de nuevos sensores abre el camino a nuevos descubrimientos científicos, los cuales posibilitarán a su vez la creación de dispositivos más sofisticados, generándose un proceso retroalimentado clave en la evolución de la Ciencia y la Tecnología. Por esta razón, cada vez es mayor el presupuesto y el esfuerzo invertido en el desarrollo de nuevos dispositivos sensores y/o en la mejora de los ya existentes.

## 1.1. Definición

El poderoso avance de la biotecnología en las últimas décadas ha permitido el desarrollo de una nueva generación de sensores, denominados *biosensores* [2,3]. Suele ser habitual pensar, erróneamente, que un biosensor es un sensor de sustancias biológicas. En realidad, un biosensor se define como un dispositivo analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, ADN, anticuerpos, células o un microorganismo) o biomimético (aptámeros, polímeros de huella molecular, etc.) en contacto con un transductor (electroquímico, óptico, magnético, mecánico...) capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que entre el receptor biológico y su molécula complementaria, y convertirla en una señal que pueda ser cuantificada.

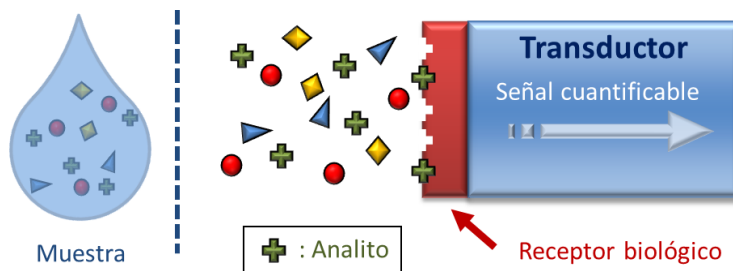


Figura 1 – Esquema básico de funcionamiento de un biosensor.

En un biosensor (ver Figura 1), la muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar el analito (la sustancia a determinar) para el cual está diseñado el receptor biológico. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, produciendo este último una señal cuantificable proporcional a la concentración del analito detectado.

## 1.2. Características y propiedades

Los dos constituyentes del biosensor (receptor biológico y transductor) están integrados conjuntamente, confiriendo a los dispositivos biosensores sus especiales características de **selectividad** y **sensibilidad**. Aunque sin duda la característica más

importante de todo biosensor, en comparación con las técnicas de análisis estándar (cromatografía, espectrometría...), es la posibilidad de realizar el análisis de la sustancia a determinar en **tiempo real** y de **forma directa**, a diferencia de cualquier análisis biológico o clínico en el cual siempre se requiere la utilización de algún marcador molecular (ya sea colorimétrico, quimio-luminiscente, quimio-fluorescente o radioactivo). Estas características confieren a los biosensores la posibilidad de realizar, no sólo un análisis cualitativo y cuantitativo, sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación...) y por tanto, elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Pocas técnicas biotecnológicas permiten la evaluación en tiempo real de la cinética de la interacción, razón por la cual las técnicas biosensoras se están imponiendo en todas aquellas áreas donde es fundamental conocer en detalle la cinética de la interacción biomolecular, como por ejemplo, en la evaluación de fármacos.

**Tabla 1 – Comparativa general entre biosensores y técnicas analíticas.**

TÉCNICAS CONVENCIONALES	BIOSENSORES
Largos tiempos de análisis	Análisis rápido (en tiempo real)
Manejo por parte de personal especializado	Fáciles de usar
Técnicas caras	Técnicas baratas
Técnicas de laboratorio	Portátiles, miniaturizables y automatizables
Multianálisis	En su mayoría monoanálisis
Necesidad de marcador	Marcador no necesario
Pequeño volumen de muestra	Muy reducido volumen de muestra
Requiere pre-tratamiento de la muestra	Mínimo pre-tratamiento de muestra
Sensibles, precisos y fiables	Sensibles, precisos y fiables

Aunque existen multitud de biosensores distintos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, muchos de estos ofrecen también la ventaja de la facilidad de manejo, el pequeño tamaño y la portabilidad, lo que posibilita su utilización en lugares inviables para una técnica analítica convencional, como el hogar o la consulta del médico (por ejemplo los sensores electroquímicos de glucosa [4]). Otro aspecto destacable es la necesidad de una cantidad de muestra relativamente baja para hacer el análisis (del orden de micro a nanolitros), lo que es importante cuando se trata de

análisis de sangre o de ADN, o si la muestra es cara o difícil de conseguir. Dependiendo también del tipo de biosensor empleado, generalmente, el coste por dispositivo suele ser bajo, y con las modernas técnicas de micro o nanofabricación también es posible disponer de sistemas multibiosensores que permitan la medida simultánea de diversos analitos con la misma cantidad de muestra. A modo de resumen, la Tabla 1 incluye las ventajas e inconvenientes generales más importantes de los biosensores frente a las técnicas de análisis convencionales.

### 1.3. Aplicaciones

En cuanto a sus aplicaciones, el uso de biosensores puede extenderse a multitud de campos ya que, con el receptor biológico adecuado, esta tecnología permite la determinación de casi cualquier sustancia química o biológica existente. Numerosas sustancias como fármacos, toxinas, moléculas orgánicas (urea, glucosa, colesterol, antibióticos, etc.), agentes patógenos de la guerra química y bacteriológica, células vivas, hormonas, péptidos, pesticidas, disruptores endocrinos, proteínas (albúmina, insulina, inmunoglobulinas, antígenos, etc.), son susceptibles de ser detectadas mediante el uso de un biosensor [5,6]. Además, hoy en día, los espectaculares progresos que ha experimentado la biotecnología en los últimos años permiten obtener biomoléculas específicas (anticuerpos y aptámeros) frente a prácticamente cualquier sustancia química o biológica cuyo peso molecular sea superior a 200 unidades de masa atómica. Para hacerse una idea de la cantidad e importancia de las aplicaciones biosensoras, basta con decir que se estima que en 2016 el mercado de los biosensores exceda los 16 billones de dólares [7].

Es tal el número de dispositivos biosensores desarrollados, la variedad de mecanismos físico-químicos de transducción que se han empleado para traducir la interacción biológica, y la variedad de aplicaciones en los que se emplean este tipo de dispositivos (diagnóstico clínico, investigación biomédica, control medioambiental, industria alimentaria o farmacéutica), que su clasificación se ha convertido en una tarea de gran dificultad. De hecho, actualmente no existe un libro o review que haya sido capaz de agrupar todos los dispositivos biosensores existentes, siendo esta tarea muy compleja debida a la gran cantidad de nuevos dispositivos que se presentan anualmente en revistas científicas. Sin embargo, atendiendo a la definición de biosensor, es posible establecer un criterio inicial de clasificación teniendo en cuenta los dos elementos que caracterizan a todo biosensor: el receptor biológico y el transductor.

### 1.4. Tipos de biosensores

Teniendo en cuenta la naturaleza, características y propiedades del receptor biológico, los biosensores pueden dividirse según el *tipo de interacción* que se produce entre el analito y el receptor (directa o indirecta), el *tipo de receptor* empleado (anticuerpo, enzima, ADN, aptámeros...) o la naturaleza del proceso

bioquímico empleado. Dentro de esta última categoría, suele ser habitual, clasificar a los biosensores en:

- *Biosensores basados en reacciones catalíticas.* La reacción de reconocimiento molecular va seguida de una modificación química del analito, que posibilita la detección [8]. Dentro de ellos cabe destacar los basados en microorganismos, secciones de tejidos o enzimas. Estos últimos son los más utilizados. Las enzimas son proteínas encargadas de catalizar las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En general, la reacción catalítica enzimática es eficiente, extremadamente selectiva y auto-reversible, lo cual es de gran utilidad en aplicaciones analíticas. La mayor desventaja de este tipo de biosensores es que (en muchas ocasiones) su producción es algo más cara, ya que requiere aislar previamente las enzimas, y además, una vez aisladas no siempre son estables y a menudo necesitan de cofactores para mantener su actividad.
- *Biosensores basados en reacciones de afinidad.* El proceso de reconocimiento molecular se basa en la afinidad característica de un ligando con su receptor [9] (anticuerpos, receptores proteicos, ADN, ARN...). Como la reacción de reconocimiento no genera productos detectables, es necesario utilizar técnicas de transducción asociadas al proceso de interacción en sí, tales como cambios de masa, modificación de propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas. En este grupo destacan los inmuno-sensores [10] (reacciones antígeno-anticuerpo) y más recientemente, los biosensores de ADN [11,12] (hibridación de cadenas de ADN). La gran especificidad y afinidad de este tipo de interacciones confiere a este tipo de sensores una especial selectividad y sensibilidad. Como contrapartida, este tipo de sensores debe minimizar las uniones inespecíficas y en ocasiones, proporcionar cierta reversibilidad a la reacción de afinidad mediante el empleo de agentes de regeneración. Además, estos agentes de regeneración no deben alterar la capacidad de reconocimiento del receptor empleado, permitiendo así la realización de múltiples análisis.

De forma similar, teniendo en cuenta el tipo de transductor empleado, los biosensores se pueden clasificar, mayoritariamente, en cuatro grandes grupos:

- *Biosensores electroquímicos.* En estos, el transductor mide el cambio electroquímico que se produce en el medio como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular, cambio que es proporcional a la concentración de analito a determinar. Las enzimas son los tipos más comunes de elementos de bioreconocimiento empleados en este tipo de biosensores. Los transductores electroquímicos [13,14] son simples de fabricar y usar. También son fiables, de respuesta rápida, precisan instrumentación de bajo coste y no requieren del tratamiento previo de la muestra. Entre estos biosensores, se incluyen: los biosensores amperométricos, los potenciométricos (donde destacan los ISFET, transistores de efecto de campo iónico sensibles), impedimétricos y los conductimétricos. Recientemente, los biosensores electroquímicos han

experimentado un poderoso auge con la incorporación de los nanotubos de carbono [15,16]. Los nanotubos de carbono poseen propiedades eléctricas inigualables y pueden ser biofuncionalizados, lo que les convierte en excelentes candidatos para ser utilizados como transductores electroquímicos.

- *Biosensores mecano-acústicos.* Los transductores acústicos detectan cambios de masa a través de una microbalanza formada por un cristal piezoeléctrico [17] en cuya superficie se haya un receptor biológico específico del analito que se desea detectar. Los micromecánicos, sin embargo, utilizan micropalanca similares a las empleadas en microscopía de fuerza atómica [18]. En este tipo de sensores, la reacción de reconocimiento molecular se produce sobre la superficie de la micropalanca y puede ser cuantificada de forma estática o dinámica. En la situación estática, la reacción de reconocimiento produce una deflexión nanométrica en la palanca proporcional a la masa de analito involucrada en la reacción de reconocimiento, pudiéndose cuantificar dicha deflexión (y por lo tanto, la cantidad de analito) por medio de un haz de luz reflejado por la micropalanca o transmitido a través de ella. En el caso dinámico, la micropalanca se encuentra oscilando a su frecuencia de resonancia, la cual al depender de la masa de la micropalanca, variará tras producirse la reacción de reconocimiento. De esta forma, la variación de la frecuencia de resonancia de la palanca determina la cantidad de analito involucrada en la reacción de reconocimiento.
- *Biosensores magnéticos.* Este tipo de biosensores emplea micro o nanopartículas magnéticas recubiertas con un elemento de reconocimiento molecular que es el encargado de atrapar al analito de interés. Posteriormente, otro elemento (matriz, gel...) debe atrapar únicamente aquellas partículas magnéticas en cuya superficie se haya producido la reacción de reconocimiento molecular. Finalmente, mediante algún tipo de técnica o sensor magnético (generalmente, efecto Hall o variaciones de magneto-resistencia o magneto-impedancia) se detecta el número de partículas magnéticas con analito en su superficie, siendo la señal magnética proporcional al número de estas [19,20].
- *Biosensores ópticos.* Los transductores ópticos son aquellos que detectan la reacción de reconocimiento a través de los cambios que esta genera en las propiedades ópticas del transductor [21], ya sea a través de la fluorescencia, polarización, dispersión, cambios de índice de refracción, etc. Los biosensores desarrollados durante esta tesis doctoral pertenecen a este tipo y por eso, serán tratados con mayor detalle en el siguiente punto.

Para finalizar este apartado introductorio sobre los dispositivos biosensores decir que, de los diferentes tipos de biosensores mencionados, los basados en principios electroquímicos han dominado claramente el mercado debido al bajo coste y fácil fabricación en serie. No en vano, el primer dispositivo biosensor desarrollado en 1962 (el biosensor de glucosa [22]) era de este tipo (también el primero que fue

comercializado en 1975 por *Yellow Spring Instruments*). Sin embargo, en los últimos años, los biosensores ópticos, y en especial los basados en plasmones superficiales, se están imponiendo como alternativa tecnológica comercial. Los mecano-acústicos y magnéticos, cuya gran sensibilidad ha sido demostrada experimentalmente en los últimos años [23–25], también han sido comercializados aunque a menor escala. Aún menos desarrollada está la posibilidad de combinar diferentes tipos de transducción [26], aunque ya se han realizado diversos estudios para formar biosensores electroquímico-ópticos [27], mecano-ópticos [28,29] o acusto-ópticos [30,31].

**Tabla 2 – Tipos de biosensores según el tipo de receptor o transductor empleado.**

RECEPTOR BIOLÓGICO	
Tipo	Clase
Proceso bioquímico	Catalíticos
	Afinidad
Tipo de interacción	Directa
	Indirecta
Tipo de receptor	Anticuerpos, ADN, enzimas, aptámeros, microorganismos, células, secciones de tejidos, polímeros de huella molecular, etc.
TRANSDUCTOR	
Tipo	Clase
Electroquímicos	Amperométricos
	Potenciométricos
	Conductimétricos
	Impedimétricos
Mecano-acústicos	Piezoeléctrico
	Nanomecánico
Magnéticos	Efecto Hall
	Magneto-resistivos
	Magneto-impedancia
Ópticos	Bio-optrodo
	Campo evanescente

## Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos presentan indudables ventajas con respecto a los electroquímicos, como por ejemplo: un mayor nivel de sensibilidad, el no ser necesarios electrodos de referencia, la inmunidad ante interferencias eléctricas, una mayor versatilidad, o la posibilidad de operar en ambientes agresivos donde los eléctricos no son operativos.

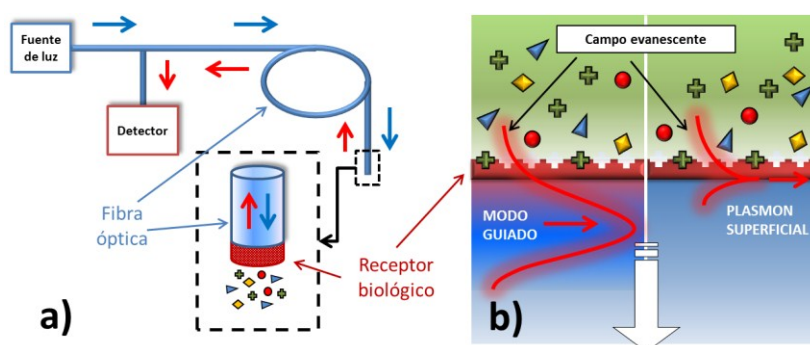
Dentro de los biosensores ópticos existen numerosos subtipos. Estos pueden agruparse en dos grandes categorías: los bio-optroodos y los basados en campo evanescente.

- *Bio-optroodos.* En estos, una guía de ondas (generalmente una fibra óptica) se utiliza como un simple conductor de la luz. De esta forma, gracias a la guía de ondas (ver Figura 2-a)), la luz puede introducirse y recogerse de la celda donde tiene lugar la reacción de reconocimiento molecular [32,33]. En estos sensores, la interacción entre el analito y un reactivo inmovilizado en la salida de la fibra produce un cambio cuantificable en las propiedades ópticas del transductor (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión). En este tipo de dispositivos, es necesaria la utilización de marcadores ópticamente activos como colorantes sensibles al pH o a la concentración de oxígeno, moléculas fluorescentes, y en menor medida, moléculas bio- o quimio-luminiscentes.
- *Basados en campo evanescente.* En esta segunda categoría se hace uso de la forma particular en que las ondas electromagnéticas pueden ser confinadas y guiadas entre determinados medios o nanoestructuras [34]. Los biosensores ópticos de esta segunda clase son los más numerosos y comparten dos características: la utilización de algún tipo de modo electromagnético (guiado o localizado) y el **principio de detección de campo evanescente**. En este método de detección, los cambios superficiales de índice de refracción generados como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular (ver Figura 2-b)), son detectados gracias a que el campo evanescente de los modos guiados actúa como sonda. De esta forma, determinando la variación experimentada por las condiciones de guiado como consecuencia de la alteración local del índice de refracción, será posible cuantificar la cantidad de analito involucrada en la reacción de reconocimiento molecular.

En los biosensores ópticos basados en campo evanescente, la distancia de penetración de dicho campo puede ir desde unos pocos hasta los cientos de nanómetros, dependiendo de la configuración del sensor empleado. Este campo evanescente ofrece una oportunidad única e ideal para medir cualquier reacción bioquímica que tenga lugar en su interior (ver Figura 2-b)). Además, como la onda evanescente decae exponencialmente en el medio dieléctrico (también llamado medio externo), sólo pueden ser detectados los cambios producidos en las proximidades de la superficie de la guía o en la interfase metal/dieléctrico en el caso de los modos plasmónicos. Por esta razón, la interferencia de otras sustancias



presentes en la muestra a analizar es mínima. Esto hace que este tipo de dispositivos sean ideales para la detección de analitos mediante métodos de afinidad, ya que en ellos se minimiza la interferencia de otras sustancias presentes en la muestra, sin que además sea necesaria la utilización de ningún tipo de marcador molecular [35]. Es por esto que, en las últimas dos décadas, los biosensores ópticos de campo evanescente se han convertido en herramientas indispensables para el análisis e identificación (en tiempo real y con un alto grado de sensibilidad y selectividad) de especies químicas o biológicas. Dentro de los modos electromagnéticos guiados existen cinco modos guiados de muy diferente naturaleza: las *guías dieléctricas convencionales*, fibras ópticas [36]; las *guías planas*, como por ejemplo, espejos resonantes [37,38], guías bimodales [39], dispositivos interferométricos de tipo Young [40], Fabry-Perot [41], Mach-Zender [42,43] y Hartmann [44]; los *cristales fotónicos* [45,46]; los *modos guiados circulares*, por ejemplo, *anillos resonantes* [47,48]; y finalmente, los *modos guiados en la interfase de un metal y un dieléctrico*, también conocidos como plasmones superficiales [49,50]. Otro tipo de campo electromagnético, el cual genera un campo evanescente capaz de penetrar en el medio externo, son los denominados plasmones localizados [51,52]. Como su propio nombre indica, estos modos no se propagan y por lo tanto, no pueden catalogarse como modos guiados. Aun así, el campo evanescente generado durante su excitación puede igualmente emplearse como “sonda” para determinar lo que ocurre en el medio externo.



**Figura 2 – Clasificación de los tipos de biosensores ópticos: (a) bio-optrodo y (b) de campo evanescente. Dentro de estos últimos destacan los basados en guías planas y en plasmones superficiales.**

Resulta difícil establecer cuál de todos los tipos de biosensores ópticos basados en campo evanescente es el más sensible, ya que para ello se debería realizar una comparación bajo estrictas condiciones de igualdad (ruido electrónico, estabilidad, condiciones de inmovilización y detección, etc). Aun así, atendiendo a los límites de detección<sup>2</sup> experimentalmente alcanzados (o estimados), publicados hasta la fecha para cada tipo de biosensor óptico, se puede establecer una tabla comparativa (ver Tabla 3). Según los datos indicados en la Tabla 3, parece que los sensores interferométricos están un peldaño por encima del resto en cuanto a capacidad de detección. Sin embargo, durante las dos últimas décadas los

<sup>2</sup> La mínima cantidad detectable con un cierto grado de certeza. Abreviado como LOD, del inglés *Limit of Detection*.

biosensores ópticos basados en plasmones superficiales (también conocidos como **biosensores SPR**) han sido los más utilizados, debido fundamentalmente a su mejor combinación entre simplicidad y sensibilidad. Estos poseen una gran ventaja respecto al resto de técnicas, ya que no requieren complicados y costosos procesos de nano o microfabricación o de acoplamiento de la luz. Además, estos dispositivos están compuestos por elementos ópticos y optoelectrónicos convencionales, razón por la cual han sido los más ampliamente desarrollados y comercializados. Y es que, el éxito comercial de un dispositivo sensor no está únicamente ligado a su capacidad de detección. Aspectos como la sencillez, robustez, capacidad de miniaturización o integración con otras tecnologías, o la posibilidad de fabricación en serie, son aspectos determinantes a la hora de establecer la utilidad de una técnica o dispositivo biosensor.

**Tabla 3 – Comparativa sensora entre los diferentes tipos de biosensores ópticos basados en campo evanescente.**

TIPO	LOD (pg/mm <sup>2</sup> ) *	LOD (RIU) **	REF.
Fibras ópticas	n.d. #	10 <sup>-7</sup>	[53]
Espejos resonantes	0,1	10 <sup>-6</sup>	[38]
Guías bimodales	n.d. **	10 <sup>-7</sup>	[39]
Interferómetro Mach-Zender	0,01 – 0,06	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>	[54,55]
Interferómetro Young	0,01 – 0,75	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-9</sup>	[56,57]
Interferómetro Hartmann	n.d.	10 <sup>-6</sup>	[58]
Cristal fotónico bidimensional	0,4	10 <sup>-5</sup>	[59]
Anillos resonantes	1	10 <sup>-7</sup>	[60,61]
Plasmones superficiales (Biosensor SPR)	1 – 5	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-8</sup>	[50]
Plasmones localizados (Biosensor LSPR)	n.d.	10 <sup>-4</sup>	##

\* LOD (RIU) – Límite de detección en Unidades de Índice de Refracción ( del inglés, *Refractive Index Unit*)

\* LOD (pg/mm<sup>2</sup>) – Límite de detección en densidad superficial de masa

# n.d. – no determinado

## Respecto a los biosensores LSPR decir que su LOD (RIU) es muy bajo debido a la menor distancia de penetración del campo electromagnético y su LOD (pg/mm<sup>2</sup>) muy difícil de calcular, ya que es difícil estimar el tamaño de la superficie sensora. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la sensibilidad superficial de estos dispositivos puede ser mayor que la de los biosensores SPR [62].

# Capítulo 2

## RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

*“La única forma de descubrir los límites de lo posible  
es sobrepasarlos e ingresar en lo imposible”*

*SEGUNDA LEY DE CLARKE*

---

La naturaleza, propiedades y capacidad de interacción de la luz con la materia, es algo que ya comenzaron a estudiar hace mucho tiempo los antiguos griegos. Sin embargo, no fue hasta bien entrado el s. XVII cuando realmente empezaron a entenderse ciertos comportamientos. Fue Snell el que inició la Óptica Clásica con la formulación en 1621 de la Ley de refracción que lleva su nombre. Posteriormente, Descartes (1637) y Fermat (1657) profundizaron en este fenómeno. En 1665, Hooke observó el fenómeno de difracción y le atribuyó un carácter ondulatorio a la luz, a diferencia de Newton que, ese mismo año, atribuyó a la luz una naturaleza corpuscular. La fama y renombre de Newton hizo que la teoría corpuscular tuviera mayor credibilidad que la ondulatoria, a pesar de que ambas teorías se apoyaban en resultados experimentales. El debate no volvió a reabrirse hasta inicios del s. XIX como consecuencia de los trabajos sobre interferometría de Young y la demostración de Fresnel-Arago del comportamiento ondulatorio de la luz. Entonces, en 1876 llegó uno de los momentos claves de la Óptica y la Física con la presentación por parte de Maxwell de sus famosas ecuaciones, proporcionando una explicación a la mayoría de los fenómenos ópticos observados hasta el momento, y convertían a la luz en “simple” onda electromagnética. Aun así, todavía había muchas incógnitas en torno a la luz. Años después, Michelson (1881) refutó experimentalmente el concepto del Éter introducido por Descartes 200 años antes, mientras Hertz (1888) verificaba experimentalmente las ecuaciones de Maxwell a la vez que observaba que la generación de ondas electromagnéticas surge de la oscilación colectiva de cargas eléctricas. Los físicos de la época no lograban encajar todas las piezas del puzle y para

mayor desconcierto, en 1905, un jovencísimo Einstein rompía con muchos conceptos prestablecidos hasta el momento y postulaba la *Teoría de la Relatividad*, introduciendo además el concepto de *fotón* y el *Efecto Fotoeléctrico*. De esta forma, la teoría corpuscular volvía a ganar adeptos. Finalmente, en 1920, De Broglie reconcilió ambas teorías (corpuscular y ondulatoria) gracias a la introducción del concepto de dualidad, lo cual supuso un gran avance para el estudio y comprensión de muchos fenómenos de **interacción de la luz con la materia**.

El fenómeno de *Plasmón Superficial* fue observado inicialmente por Wood en 1902 [63] al analizar la luz policromática reflejada por un espejo que poseía una red de difracción en su superficie. Dicha luz reflejada presentaba un patrón de franjas que Wood no era capaz de interpretar. La interpretación física del fenómeno fue iniciada por Rayleigh [64] y posteriormente refinada, en 1941, por Fano [65]. Fue este último el que introdujo el concepto de *polaritón*: quasipartícula resultante de la oscilación colectiva de los electrones como resultado de la interacción de la luz, es decir fotones, con la materia. Sin embargo, la primera descripción teórica de la resonancia de plasmón superficial la proporcionó Ritchie en 1957 [66]. Aún hubo que esperar 11 años más (1968) hasta que el propio Ritchie [67] relacionara el plasmón superficial con las ondas superficiales de Sommerfeld y el fenómeno observado por Wood 66 años antes. Ese mismo año, Otto [68] y Kretschmann-Raether [69] presentaron dos sencillos métodos de excitación de SPP en capas de metales nobles, estableciéndose así las bases de lo que hoy se conoce como *Plasmónica*.

## 2.1. Teoría electromagnética de plasmones superficiales

Las *ondas de plasmón superficial* son oscilaciones colectivas de electrones libres en la interfase plana entre dos medios cuyas constantes dieléctricas poseen partes reales de signos opuestos (generalmente un metal y un dieléctrico, aunque también puede generarse en semiconductores dopados). El término deriva del concepto de plasma y se debe a que ambos, plasma y plasmón superficial, están constituidos por partículas cargadas que pueden responder de forma colectiva. Los plasmones superficiales pueden excitarse mediante electrones [70,71], fonones [72] o fotones [73]. En este último caso, los electrones libres responden colectivamente oscilando en resonancia a la misma frecuencia que la luz incidente. De ahí que a la creación o excitación de plasmones superficiales mediante luz se la denomine usualmente *Resonancia de Plasmón Superficial* (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*), aunque estrictamente hablando se trata de un *plasmón-polaritón* superficial. Por esta razón, en clara referencia a su carácter híbrido, también se le denota como SPP (del inglés *Surface Plasmon Polariton*).

Existen dos tipos distintos de *plasmones superficiales* con extraordinarias cualidades, los *propagantes* y los *localizados*. Los de tipo **propagante**, denotados como SPP se producen en la frontera plana entre un metal (los más usados son el oro y la plata) y un dieléctrico, como consecuencia de la oscilación colectiva de los electrones libres del metal próximos a su superficie [74]. Esta oscilación colectiva genera una onda electromagnética que se propaga a lo largo de la interfase entre

ambos medios<sup>3</sup>, generando un campo electromagnético muy intenso, cuyo máximo de intensidad se localiza en la interfase metal/dieléctrico y decae exponencialmente a ambos lados de esta (ver Figura 3-a)). El otro tipo de plasmones superficiales, **los localizados**, se generan en nanoestructuras metálicas aisladas (por ejemplo, nanopartículas de oro). Este tipo suele denotarse como LSPP, del inglés *Localized Surface Plasmon Polariton*, quedando reservado el término *Plasmón Superficial* (o SPP) para los de tipo propagante. Como su propio nombre indica, en este caso el LSPP no se propaga si no que se localiza en la región de la nanoestructura (ver Figura 3-b)). Ya que en esta memoria sólo se va a trabajar con los de tipo propagante, los LSPP no han sido analizados, debido a su diferente naturaleza. Aun así, se introducen para explicar las diferencias existentes entre estos y los de tipo propagante. Si se desea profundizar más sobre los LSPP, existe numerosa bibliografía al respecto [75,76].

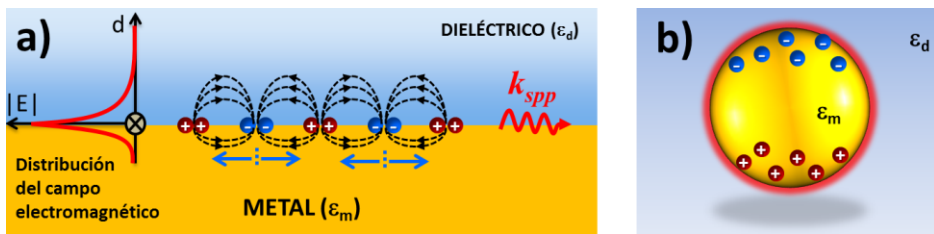


Figura 3 – Diferentes tipos de plasmones superficiales: (a) propagantes [SPP] y (b) localizados [LSPP].

Al igual que en el caso de los modos electromagnéticos de las guías de onda, los SPP quedan caracterizados a través de su vector de ondas. La obtención del vector de ondas de este modo superficial puede afrontarse desde diferentes puntos de vista [66,73,74,77]. El análisis del problema desde el punto de vista de la Óptica Integrada conduce a una solución sencilla, intuitiva y elegante. En esta aproximación, partiendo de las ecuaciones de Maxwell se obtienen las ecuaciones de ondas de una guía de onda plana, la cual conduce de una forma muy sencilla hasta el vector de ondas del SPP.

### 2.1.1. Modos guiados

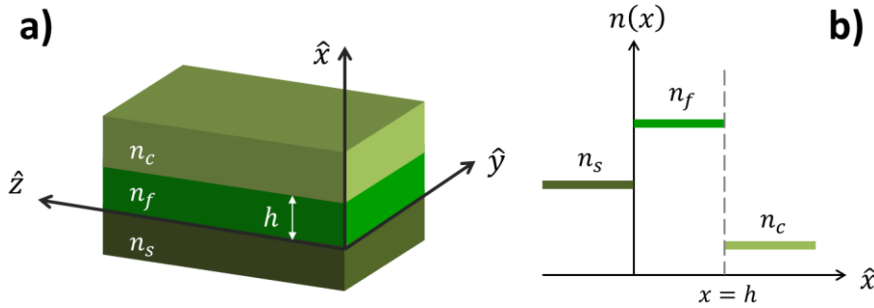
Si se toma  $\hat{x}$  como la dirección de confinamiento,  $\hat{z}$  como la de propagación y asumiendo un perfil de índice de refracción general  $n(x)$ , las ecuaciones de ondas para los diferentes modos ópticos (*transversal eléctrico* TE y *transversal magnético* TM) vendrán dadas, respectivamente, por las siguientes ecuaciones [78]:

$$\text{Modos TE: } \partial^2 E_y / \partial x^2 = (\beta^2 - k_0^2 \cdot n(x)^2) \cdot E_y \quad (1)$$

<sup>3</sup> De forma similar a las ondas que se propagan en un estanque cuando una piedra es arrojada en su interior.

$$\text{Modos TM: } n(x)^2 \cdot \frac{\partial}{\partial x} \cdot \left( \frac{1}{n(x)^2} \cdot \frac{\partial H_y}{\partial x} \right) = (\beta^2 - k_0^2 \cdot n(x)^2) \cdot H_y \quad (2)$$

donde  $k_0 = \omega/c = \omega \cdot \sqrt{\epsilon_0 \cdot \mu_0}$ ,  $\beta$  es la constante de propagación (o vector de ondas) del modo guiado y por último,  $E_y$  y  $H_y$  las componentes de campo eléctrico y magnético en la dirección  $\hat{y}$ , respectivamente. Estas ecuaciones describen la propagación de la luz a lo largo de una guía con un perfil de índice de refracción arbitrario  $n(x)$ . Por sencillez se ha suprimido el subíndice  $v$  que usualmente denota el número de modo.



**Figura 4 – Guía de onda plana con perfil de salto de índice. (a) Esquema tridimensional de la guía y (b) su correspondiente perfil de índice de refracción.**

En el caso de que la guía de onda plana posea un perfil de salto de índice como el indicado en la Figura 4, resultará sencillo obtener las soluciones de las ecuaciones de onda de los modos ópticos. Según lo indicado en la Figura 4, el perfil de índice será tal que:

$$\varepsilon(x) = \varepsilon_c = n_c^2, \quad x > h \quad (3.a)$$

$$\varepsilon(x) = \varepsilon_f = n_f^2, \quad 0 \leq x \leq h \quad (3.b)$$

$$\varepsilon(x) = \varepsilon_s = n_s^2, \quad x < 0 \quad (3.c)$$

donde una lámina de espesor  $h$  e índice de refracción uniforme  $n_f$  (denominada *núcleo*) se sitúa entre dos láminas semi-infinitas (denominadas *sustrato* y *cubierta*) con índices de refracción uniformes  $n_s$  y  $n_c$ , respectivamente, tales que  $n_f > n_s > n_c$ .

Los modos TE y TM soportados por este tipo de estructura asimétrica pueden dividirse en *modos guiados* y *modos de radiación*. A su vez, estos últimos pueden distinguirse en *modos de semi-radiación* y *modos evanescentes*. En cada medio, las soluciones de las ecuaciones de ondas (1) y (2) pueden ser expresadas como la combinación lineal de funciones del tipo  $A_i \cdot e^{-i \cdot \kappa_i \cdot x}$  y  $B_i \cdot e^{i \cdot \kappa_i \cdot x}$ , donde  $\kappa_i$  es la constante de propagación del medio  $i$  definida por:

$$\kappa_c^2 = n_c^2 \cdot k_0^2 - \beta^2 = -\gamma_c^2 \quad (4.a)$$

$$\kappa_f^2 = n_f^2 \cdot k_0^2 - \beta^2 \quad (4.b)$$

$$\kappa_s^2 = n_s^2 \cdot k_0^2 - \beta^2 = -\gamma_s^2 \quad (4.c)$$

donde los subíndices  $f, s$  y  $c$  hacen referencia al *núcleo*, el *sustrato* y la *cubierta*, respectivamente. La constante de decaimiento transversal ( $\gamma_c$  y  $\gamma_s$ ) da cuenta de la distancia de penetración del campo en ese medio.

Además de esto último, según las condiciones de frontera de las ecuaciones de Maxwell, las componentes de las amplitudes de campo eléctricas y magnéticas paralelas a una discontinuidad han de ser continuas en ese punto. Esto implica que:

- Modos TE

En este caso, las condiciones de frontera exigen que  $E_y$  y  $\partial E_y / \partial x$  (y por lo tanto,  $H_x$  y  $H_z$ ) sean continuas en  $x = d$  y  $x = 0$ , mientras que la distribución transversal de campo eléctrico de los modos TE ha de ser de la forma:

$$E_y = E_c \cdot e^{-\gamma_c \cdot (x-h)} \quad x > h \quad (5.a)$$

$$E_y = E_f \cdot \cos(\kappa_f \cdot x - \phi_s) \quad 0 \leq x \leq h \quad (5.b)$$

$$E_y = E_s \cdot e^{\gamma_s \cdot x} \quad x < 0 \quad (5.c)$$

Tras imponer las condiciones de frontera se obtiene que:

$$E_f^2 \cdot (n_f^2 - N^2) = E_s^2 \cdot (n_f^2 - n_s^2) = E_c^2 \cdot (n_f^2 - n_c^2) \quad (6)$$

$$\tan \phi_s^{TE} = \gamma_s / \kappa_f \quad y \quad \tan \phi_c^{TE} = \gamma_c / \kappa_f \quad (7)$$

$$\boxed{\kappa_f \cdot h - \phi_s^{TE} - \phi_c^{TE} = \nu \cdot \pi} \quad (8)$$

siendo esta última ecuación la denominada ecuación de dispersión de los modos TE de una guía plana unidimensional, y  $\phi_s^{TE}$  y  $\phi_c^{TE}$  los saltos de fase de Fresnel de los modos guiados TE producidos en la discontinuidad núcleo/sustrato y núcleo/cubierta, respectivamente<sup>4</sup>. El parámetro  $N$  se denomina índice de refracción efectivo y se define como  $N = \text{Re}(\beta) / k_0$ . El  $N$  de un modo guiado ha de ser menor que el índice de refracción del núcleo, pero mayor que el índice del sustrato y de la cubierta ( $n_f > N > n_s$  y  $n_c$ ).

---

<sup>4</sup> El salto de fase de Fresnel en una discontinuidad  $n_1/n_2$  en el caso de luz incidente con polarización TE se define como  $\tan \phi^{TE} = \sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2 \theta_1 - n_2^2} / (n_1 \cdot \cos \theta_1)$ .

- Modos TM

De forma similar al caso anterior, las condiciones de frontera en el caso TM exigen que  $H_y$  y  $(1/n(x)^2 \cdot \partial H_y / \partial x)$  (y en consecuencia,  $(\varepsilon(x) \cdot E_x)$  y  $E_z$ ) sean continuas en  $x = d$  y  $x = 0$ , mientras que la distribución transversal de campo magnético es similar a la de campo eléctrico para el caso de modos TE:

$$H_y = H_c \cdot e^{-\gamma_c \cdot (x-h)} \quad x > h \quad (9.a)$$

$$H_y = H_f \cdot \cos(\kappa_f \cdot x - \phi_s) \quad 0 \leq x \leq h \quad (9.b)$$

$$H_y = H_s \cdot e^{\gamma_s \cdot x} \quad x < 0 \quad (9.c)$$

En este caso, las condiciones de frontera imponen que:

$$H_f^2 \cdot \frac{(n_f^2 - N^2)}{n_f^2} = H_s^2 \cdot \frac{(n_f^2 - n_s^2)}{n_s^2} \cdot q_s = H_c^2 \cdot \frac{(n_f^2 - n_c^2)}{n_c^2} \cdot q_c \quad (10)$$

donde  $q_s$  y  $q_c$  son los denominados *factores de reducción* definidos como  $q_{s,c} = (N/n_f)^2 + (N/n_{s,c})^2 - 1$ . Obteniéndose así que:

$$\tan \phi_s^{TM} = (n_f/n_s)^2 \cdot \gamma_s/\kappa_f \quad y \quad \tan \phi_c^{TM} = (n_f/n_s)^2 \cdot \gamma_c/\kappa_f \quad (11)$$

$$\boxed{\kappa_f \cdot h - \phi_s^{TM} - \phi_c^{TM} = \nu \cdot \pi} \quad (12)$$

siendo esta última ecuación la denominada *ecuación de dispersión de los modos TM* de una guía plana unidimensional, y  $\phi_s^{TM}$  y  $\phi_c^{TM}$  los *saltos de fase de Fresnel* para los modos guiados TM<sup>5</sup>.

La ecuación de dispersión proporciona la relación que ha de cumplirse entre la constante de propagación del modo  $\nu$  ( $\beta_\nu$ ), la frecuencia angular ( $\omega$ ) y la anchura del núcleo ( $h$ ) para la existencia de un modo guiado. Según esto, una vez establecidos los valores de  $\omega$ ,  $h$  y de los índices de refracción que forman la estructura, únicamente un conjunto de valores discretos de  $\beta_\nu$  (o puede que ninguno) cumplirán la condición impuesta por las ecuaciones de dispersión.

### 2.1.2. Modos plasmónicos

Una vez resuelta la ecuación de onda de un guía de onda con perfil de salto de índice, y tras obtener las ecuaciones que relacionan y determinan la existencia de modos

---

<sup>5</sup> El salto de fase de Fresnel en una discontinuidad  $n_1/n_2$  en el caso de luz incidente con polarización TM se define como  $\tan \phi^{TM} = \left(\frac{n_1^2}{n_2^2}\right) \cdot \sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2 \theta_1 - n_2^2} / (n_1 \cdot \cos \theta_1)$ .



guiados en estas estructuras, surge la incógnita de si sería posible guiar luz en la interfase entre dos medios. Para resolver este interrogante se debe explorar el límite  $h \rightarrow 0$  de las ecuaciones de dispersión ( 8 ) y ( 12 ).

- Modos TE

Observando la ecuación ( 8 ) se aprecia que existen dos posibles situaciones: modo guiado de orden cero ( $\nu = 0$ ) y modos guiados de orden superior ( $\nu \neq 0$ ).

$$\begin{aligned} \text{sea } h = \nu = 0 &\Rightarrow \phi_s^{TE} + \phi_c^{TE} = 0 \Rightarrow \gamma_s + \gamma_c = 0 \\ \text{sea } h = 0 \text{ y } \nu \neq 0 &\Rightarrow \phi_s^{TE} + \phi_c^{TE} = -\nu \cdot \pi \end{aligned} \quad (13)$$

Por lo tanto, resulta evidente que en el caso de modos TE **no** es posible guiar luz en la interfase entre dos medios en ninguno de los dos casos. Y es que, en el caso del orden cero, las constantes de decaimiento transversal son por construcción positivas (para así obtener campos evanescentes) y por lo tanto, su suma nunca podrá ser cero. En el caso de modos de orden superior, los *saltos de fase de Fresnel* poseen por construcción un valor entre 0 y  $\pi/2$  y por lo tanto, tampoco podrá cumplirse nunca la igualdad.

- Modos TM

Por analogía con el caso anterior, tampoco sería posible guiar la luz en una interfase entre dos medios en el caso de modos TM con  $\nu \neq 0$ . Sin embargo, en el caso de modos TM de orden cero ( $\nu = 0$ ), sí que existirá una posible solución. En esta situación:

$$\text{sea } h = \nu = 0 \Rightarrow \phi_s^{TM} + \phi_c^{TM} = 0 \Rightarrow \frac{\gamma_s}{n_s^2} + \frac{\gamma_c}{n_c^2} = 0 \quad (14)$$

De tal forma que, cuando  $n_s^2$  o  $n_c^2 < 0$  (recuérdese que  $\varepsilon = n^2$ ) se podría cumplir la ecuación de dispersión del modo TM de orden cero y por lo tanto, sería posible satisfacer la condición de guiado. Esto descarta que sea posible guiar luz en la interfase entre dos medios dieléctricos, ya que usualmente la constante dieléctrica  $\varepsilon_d(\omega)$  de los materiales dieléctricos es positiva. Sin embargo, se sabe que la constante dieléctrica  $\varepsilon_m(\omega)$  de ciertos metales es negativa a determinadas frecuencias, lo que haría que fuese posible guiar luz en una interfase metal/dieléctrico. En concreto, en el rango visible, la  $\varepsilon_m(\omega)$  de ciertos metales (como por ejemplo, los nobles) puede ser expresada mediante un modelo de plasma, en el cual a frecuencias  $\omega$  inferiores a la *frecuencia de plasma*  $\omega_p$ ,  $\varepsilon_m(\omega) < 0$ . Por esta razón, este tipo de modos superficiales guiados reciben el nombre de modos plasmónicos.

### 2.1.3. Vector de ondas del plasmón superficial

Como toda onda electromagnética, el SPP queda caracterizado a través de su vector de propagación (o también denominado vector de ondas), el cual va a definir las condiciones necesarias para que el SPP pueda ser excitado (ver Figura 5).

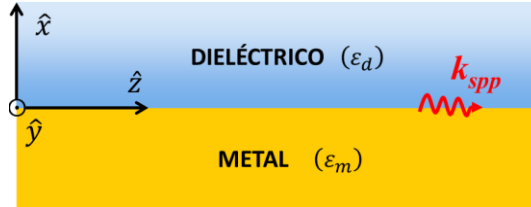


Figura 5 – Geometría de una guía plasmónica formada por la interfase entre un medio dieléctrico y un metal.

La ecuación ( 14 ) permite calcular la constante de propagación  $\beta_0^{TM}$  o vector de ondas del plasmón superficial, la cual suele ser usual denotar como  $k_{spp}$ . Desarrollando dicha ecuación e introduciendo las constantes de decaimiento dadas por el grupo de ecuaciones ( 3 ) y ( 4 ), se obtiene que:

$$k_{spp} = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad (15)$$

siendo  $\varepsilon_m$  y  $\varepsilon_d$  las constantes dieléctricas del metal y el medio dieléctrico, respectivamente, y  $k_0 = \omega/c = \omega \cdot \sqrt{\varepsilon_0 \cdot \mu_0}$ .

Esta ecuación será válida tanto para medios con  $\varepsilon_m(\omega)$  real como compleja, es decir para medios conductores con y sin absorción. En general, tanto la constante dieléctrica del metal como la del dieléctrico son complejas y se definen de la forma:

$$\varepsilon_m = \varepsilon'_m + i \cdot \varepsilon''_m \quad (16)$$

$$\varepsilon_d = \varepsilon'_d + i \cdot \varepsilon''_d \quad (17)$$

donde  $\varepsilon'_m$  y  $\varepsilon'_d$  representan, respectivamente, la parte real de la constante dieléctrica del metal y del medio dieléctrico, mientras que  $\varepsilon''_m$  y  $\varepsilon''_d$  representan sus partes imaginarias. A frecuencias correspondientes a la región visible del espectro electromagnético, la constante dieléctrica de los metales nobles puede definirse a través del modelo de Drude del gas de electrones libres como:

$$\varepsilon_m(\omega) = \varepsilon_0 \cdot \left( 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i \cdot \omega \cdot f} \right) \quad (18)$$

siendo  $f$  la frecuencia de colisión y  $\omega_p = \sqrt{\mathcal{N} \cdot e^2 / \epsilon_0 \cdot m_e}$  la denominada frecuencia de plasma, la cual queda definida a través de la concentración de electrones libres ( $\mathcal{N}$ ), su carga ( $e$ ) y la masa ( $m_e$ ) del electrón. Llegado este punto, se distinguen dos situaciones:

- En el caso de que tanto el medio dieléctrico como el conductor no posean absorción (o esta pueda ser despreciada), es decir  $\epsilon_d'' = \epsilon_m'' = 0$ , las constantes dieléctricas de los medios vendrán dadas por:  $\epsilon_d = \epsilon_d'$  y  $\epsilon_m(\omega) = \epsilon_0 \cdot (1 - \omega_p^2 / \omega^2)$ . Así, en el caso de que  $\omega < \omega_p$ , la constante dieléctrica del metal será negativa y por lo tanto, se podrá cumplir la ecuación de dispersión del modo plasmónico. Sin embargo, para que pueda existir el modo plasmónico no sólo ha de cumplirse que  $\epsilon_m'$  y  $\epsilon_d'$  sean de signos opuestos, sino que además  $|\epsilon_m'| > \epsilon_d'$ , de tal forma que  $k_{spp} \in \mathbb{R}$ . A este tipo particular de plasmones superficiales se les suele denominar *modos Fano* [79].
- A pesar de que en el caso de los medios dieléctricos la absorción puede ser generalmente despreciada ( $\epsilon_d = \epsilon_d'$ ), esta aproximación no puede ser trasladada a los metales nobles. Para estos últimos, la absorción en la región del espectro visible en la cual  $\epsilon_m' < 0$  (aquella en la que el SPP puede ser excitado) es muy importante. El hecho de que exista absorción en el metal ( $\epsilon_m'' \neq 0$ ) permite la existencia de modos plasmónicos incluso cuando  $|\epsilon_m'| < \epsilon_d'$ . Sin embargo, en este caso, la existencia de una componente imaginaria no-nula de  $k_{spp}$  lleva asociada la presencia de modos evanescentes. Aun así, existirán regiones del espectro electromagnético en las que a pesar de que la absorción del metal no puede ser despreciada, sí que se cumplirá que  $|\epsilon_m'| \gg |\epsilon_m''|$  y por lo tanto, la parte real podrá compensar en parte la absorción del metal generada por la parte imaginaria. En este caso, el vector de ondas del plasmón superficial puede ser expresado como:

$$\begin{aligned} k_{spp} &= k_{spp}' + i \cdot k_{spp}'' \simeq \\ &\simeq k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_m' \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m' + \epsilon_d}} + i \cdot k_0 \cdot \frac{\epsilon_m''}{2 \cdot (\epsilon_m')^2} \cdot \left( \frac{\epsilon_m' \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m' + \epsilon_d} \right)^{3/2} \end{aligned} \quad (19)$$

En la ecuación (19) se observa cómo, efectivamente, el término  $\epsilon_m''$  es el que genera una componente imaginaria  $k_{spp}''$  en el vector de ondas del SPP, la cual está asociada con la atenuación del plasmón superficial en la dirección de propagación. Además, se observa que esa componente imaginaria es proporcional a  $\epsilon_m'' / (\epsilon_m')^2$ , de tal forma que, efectivamente, la parte real de la constante dieléctrica del metal podrá compensar a la parte imaginaria y disminuir así el valor de  $k_{spp}''$ . La Figura 6 muestra el valor, en función de la longitud de onda, de la parte real e imaginaria del vector de ondas de un SPP que se propaga a lo largo de una interfase oro/ $n_d$  para tres valores distintos del índice de refracción del medio dieléctrico  $n_d = 1, 1,2$  y  $1,4$ . La gran dispersión exhibida por los metales es la responsable de que tanto la parte real como imaginaria del vector de ondas del SPP varíe enormemente con la longitud de onda. En el caso de emplear oro como metal, la Figura 6 muestra que ambos parámetros disminuyen de valor al aumentar la longitud de onda, fruto de la dependencia

espectral exhibida por la constante óptica del oro (ver Apéndice A). Además, esta figura muestra que ambos parámetros,  $k'_{spp}$  y  $k''_{spp}$ , aumentan de valor cuando se incrementa el índice de refracción del dieléctrico. Esta dependencia ya indica la posibilidad de ser utilizado como sensor de cambios de índice de refracción.

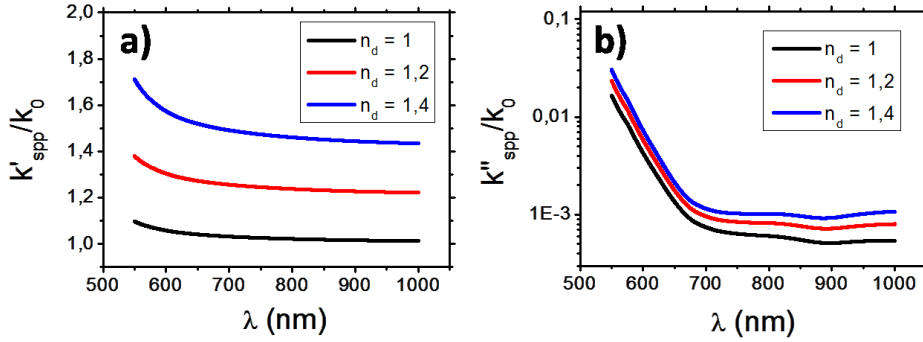


Figura 6 – Dependencia espectral del valor de la parte real e imaginaria del vector de ondas del SPP en una interfase Au/dieléctrico con  $n_d = 1, 1,2$  y  $1,4$ .

#### 2.1.4. Distribución transversal de campo electromagnético del plasmón superficial

Tras demostrar que es posible guiar luz en la interfase entre dos medios y determinar el vector de ondas asociado al modo superficial o plasmónico, el siguiente paso sería determinar la distribución de los campos electromagnéticos asociados al modo plasmónico TM ( $E_x, H_y, E_x$ ). Para ello no se tiene más que aplicar el límite  $h \rightarrow 0$  y la geometría de la Figura 5 al conjunto de ecuaciones ( 9 ), las cuales determinan la distribución transversal de campo electromagnético de una guía de onda con perfil de salto de índice. De esta forma:

$$H_{dy}(x) = H_d \cdot e^{-\gamma_d x} \quad x > 0 \quad (20.a)$$

$$H_{my}(x) = H_m \cdot e^{\gamma_m x} \quad x < 0 \quad (20.b)$$

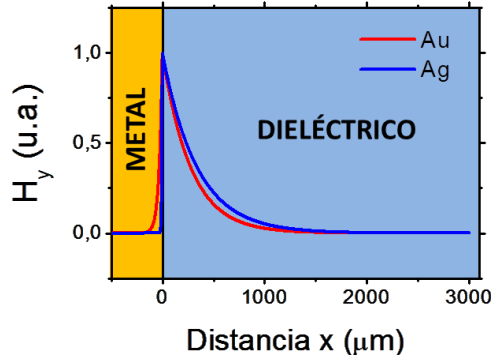
donde, como se obtiene tras sustituir la ecuación ( 18 ) en el conjunto de ecuaciones ( 4 ), las constantes de decaimiento transversal en el dieléctrico y en el metal serán:

$$\gamma_d = \sqrt{(k_{spp})^2 - \epsilon_d \cdot k_0^2} = i \cdot k_0 \cdot \frac{\epsilon_d}{\sqrt{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (21.a)$$

$$\gamma_m = \sqrt{(k_{spp})^2 - \epsilon_m \cdot k_0^2} = i \cdot k_0 \cdot \frac{\epsilon_m}{\sqrt{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (21.b)$$

La Figura 7 muestra la distribución transversal de la intensidad de campo  $H_y$  a ambos lados de la interfase metal/dieléctrico. Como se puede apreciar en esta figura,

la distribución varía dependiendo del metal que forma la interfase por la que se propaga el SPP. En concreto, en el caso de una longitud de onda de 633 nm, el campo electromagnético en el medio metálico estará más confinado si se emplea plata que si se utiliza oro. Sin embargo, la distribución transversal del campo electromagnético en el medio dieléctrico es prácticamente igual para ambos metales.



**Figura 7 – Distribución espacial transversal de campo magnético de un SPP en una interfase agua/oro ( $n_d = 1.3323$  RIU /  $\epsilon_m = -11,8+1,246\cdot i$ ) y agua/plata ( $n_d = 1.3323$  RIU /  $\epsilon_m = -18,4+2,3\cdot i$ ), para una  $\lambda = 633$  nm.**

A través de la relación existente entre los campos eléctricos y magnéticos de los modos TM será posible determinar la distribución de los campos eléctricos  $E_x$  y  $E_z$ ;  $E_x = -i \cdot 1/(\omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon(\omega)) \cdot (\partial H_y / \partial z)$  y  $E_z = -\beta / \omega \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon(\omega) \cdot H_y$ .

### 2.1.5. Distancia de penetración

Una variable importante que caracteriza a los SPP es la distancia de penetración del campo electromagnético en los medios que forman la interfase. Este decaimiento en la dirección transversal de propagación está caracterizado por la *distancia de penetración*, definida como la distancia a la interfase a la cual la amplitud del campo electromagnético decae en un factor  $1/e$ . En el caso del SPP, dicha *distancia de penetración* vendrá dada por:

$$L_i = 1/Re(\gamma_i) \quad (22)$$

donde el subíndice  $i$  se emplea para referirse al dieléctrico ( $d$ ) o al metal ( $m$ ). En este caso, resulta interesante conocer cómo varía la distancia de penetración con la longitud de onda de excitación del SPP.

Según se aprecia en la Figura 8, en el caso del oro y la plata, la longitud de penetración del campo evanescente en el medio dieléctrico es mucho mayor que en el metal ( $L_d \gg L_m$ ). Este comportamiento se corresponde con el observado en la Figura 7 para una longitud de onda de 633 nm. Comparando ambos materiales se aprecia que la distancia de penetración en el dieléctrico es muy similar en ambos casos, mientras que en el metal se observan ciertas diferencias. En concreto, para longitudes de onda por debajo de 800 nm, la distancia de penetración en el metal es

mayor en el caso del oro que en el de la plata, mientras que para longitudes de onda por encima de 800 nm las distancias de penetración se igualan. Sin duda, este comportamiento se debe a la distinta magnitud y dependencia de las constantes dieléctricas del oro y la plata, sobre todo de la parte imaginaria asociada a la absorción óptica (ver Apéndice A), confirmando la gran influencia que estas poseen en la distribución del campo electromagnético en la dirección perpendicular a la interfase por la que se propaga el SPP. En concreto, el hecho de que la distancia de penetración disminuya al aumentar la longitud de onda, se debe a la disminución que experimenta su absorción óptica. En el caso ideal de un metal perfecto, la permitividad se puede considerar infinita, y la distancia de penetración será cero.

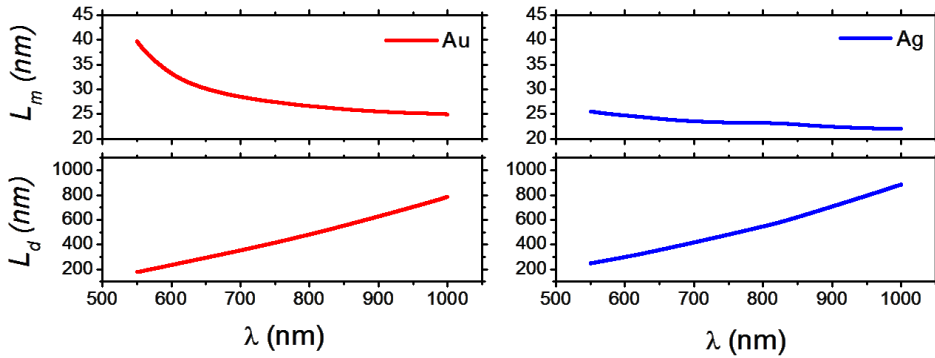


Figura 8 – Distancia de penetración de un SPP en el metal ( $L_m$ ) y en el dieléctrico ( $L_d$ ) como función de la longitud de onda de excitación. En el cálculo, se supuso agua como medio dieléctrico ( $n_d = 1.3323$ ) y como metal oro (izquierda) o plata (derecha)<sup>6</sup>.

### 2.1.6. Distancia de propagación del plasmón superficial

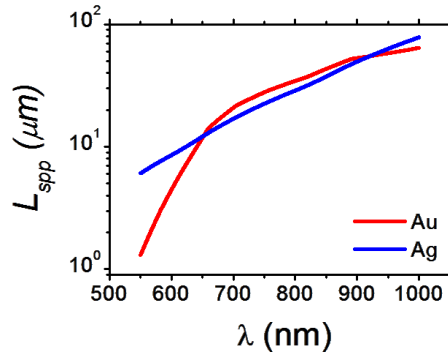
Como se comentó anteriormente, el vector de ondas del SPP posee una componente imaginaria distinta de cero como consecuencia de la absorción del metal. Esta componente imaginaria nos indica que existirá cierta atenuación del campo electromagnético en la dirección de propagación del SPP y que, por lo tanto, existirá una longitud máxima de propagación del SPP.

La atenuación de los modos guiados suele caracterizarse a través de la *distancia de propagación*, definida como la distancia en la dirección de propagación del modo a la cual la energía de ese modo decae en un factor  $1/e$ . En el caso del SPP, dicha *distancia de propagación* vendrá dada por:

$$L_{spp} = \frac{1}{(2 \cdot k''_{spp})} \quad (23)$$

<sup>6</sup> Las constantes ópticas empleadas para el oro y la plata son las indicadas en el Apéndice A.

Anteriormente se vio que, en el caso particular de que  $|\varepsilon'_m| \gg \varepsilon''_m$ , el vector de ondas del SPP queda determinado por la ecuación ( 19 ) que, por lo tanto, permite calcular fácilmente la distancia de propagación del SPP. Dicha distancia dependerá de la longitud de onda a través del parámetro  $k_0 = \omega/c = 2\pi/\lambda$ , y de las constantes dieléctricas de los medios  $\varepsilon_m$  y  $\varepsilon_d$ , las cuales a su vez dependen también de la longitud de onda de excitación del SPP. Por esta razón, es interesante conocer el valor de la distancia de propagación del SPP en función de  $\lambda$ .



**Figura 9 – Distancia de propagación de un SPP en función de la longitud de onda de excitación. En el cálculo, se supuso agua como medio dieléctrico ( $n_d = 1.3323$ ) y como metal oro (línea roja) o plata (línea azul)<sup>7</sup>.**

Debido a la absorción del medio metálico, la distancia de propagación de los modos plasmónicos en una interfase metal/dieléctrico es pequeña (ver Figura 9). Por ejemplo, en el caso de una interfase oro/agua o plata/agua, la distancia de propagación del SPP en el visible es de menos de 100 micras.

### 2.1.7. Efecto de la rugosidad superficial

Hasta ahora se ha supuesto que la interfase entre ambos medios era totalmente plana. En el caso no-ideal, la superficie del metal tendrá una cierta rugosidad que afectará a las propiedades del SPP. La magnitud de la rugosidad dependerá principalmente de las condiciones y técnica de crecimiento empleadas, del espesor de la capa depositada, así como del tipo de sustrato, y del pre y post-procesado al que sea sometida la estructura fabricada. Los valores de rugosidad alcanzables pueden ir desde  $0.1 \text{ nm}$  hasta las decenas de nanómetros. En concreto, cuando la rugosidad de la interfase no sea despreciable (del orden de un nanómetro), ésta producirá cierta dispersión en el SPP, generando una componente de radiación de luz desde el SPP al medio dieléctrico y una disminución de la distancia de propagación del SPP como consecuencia del aumento de las pérdidas [73].

<sup>7</sup> Las constantes ópticas empleadas para el Au y la Ag son las indicadas en el Apéndice A.

## 2.2. Plasmones superficiales en sistemas de multicapas

En este apartado se estudian las características y propiedades de los plasmones superficiales excitados en sistemas de multicapas. En concreto, se analiza la situación en la que una capa metálica delgada de espesor  $h$  se encuentra flanqueada por dos medios dieléctricos semi-infinitos. Si los medios dieléctricos poseen la misma constante dieléctrica la estructura resultante será *simétrica*, mientras que si son distintas, la estructura será *asimétrica*. Para llevar a cabo este estudio, basta con resolver la ecuación ( 2 ) para el perfil de índice de refracción deseado, imponiendo además una distribución transversal de campo de tipo evanescentes a ambos lados de las dos interfases [74].

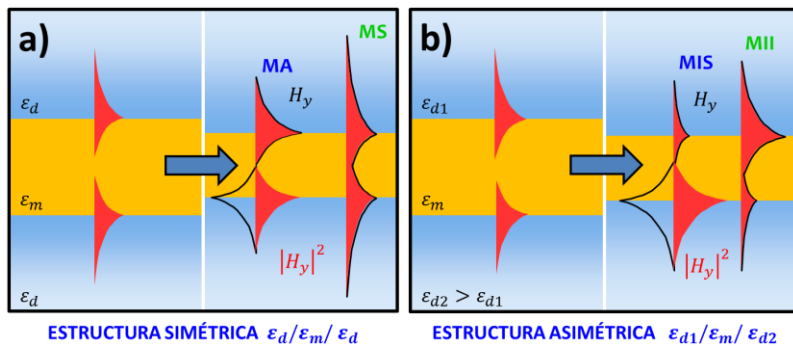


Figura 10 –Modos plasmónicos de una capa metálica de espesor finito.

### 2.2.1. Estructura simétrica

En primer lugar, se supone que la constante dieléctrica de los dos medios dieléctricos es la misma y que la capa metálica es suficientemente gruesa (ver Figura 10-a)). En esta situación se podrán excitar dos plasmones superficiales equivalentes, uno en cada una de las interfases de la capa metálica y cuya relación de dispersión vendrá dada por la ecuación ( 15 ). De esta forma, la capa metálica gruesa presenta un modo de plasmón superficial degenerado. Sin embargo, si se reduce el espesor de la capa metálica, los plasmones de cada interfase comienzan a interaccionar entre sí. Esta interacción transforma los dos modos equivalentes, y crea dos modos independientes, uno con una distribución simétrica de campo electromagnético (*modo simétrico*, MS) y otro con una distribución anti-simétrica (*modo asimétrico*, MA), rompiéndose así la degeneración. Cada uno de estos modos presenta una relación de dispersión distinta y un comportamiento diferente con respecto al espesor de la capa metálica. La Figura 11 muestra las componentes real e imaginarias del vector de ondas del SPP en el caso concreto de que  $\lambda = 633 \text{ nm}$ , la lámina metálica sea de Au ( $\epsilon_{Au} = -11.79 + 1.25 \cdot i$ ) y esté flanqueada por un dieléctrico con un índice de refracción  $n = 1.46$ . En esta figura se observa que a medida que disminuye el espesor  $h$  del metal también disminuyen tanto el valor real como el imaginario de  $k_{spp}$  del MS, mientras que en el MA se da la situación contraria. Como consecuencia de esto, se deduce que el MS tiende a extender el campo electromagnético en el dieléctrico y a estar menos confinado en el metal, haciendo que el MS se propague a mayores distancias que el SPP generado en una única



interfase [80]. Gracias a esto es posible encontrar configuraciones en las que el plasmón superficial de un modo simétrico llega a propagarse varios centímetros. Debido a este comportamiento, el modo simétrico se denomina también *modo de largo recorrido*. En contraste, el MA tiende a confinar su campo electromagnético en el metal cuando se reduce el espesor de la capa. Como resultado del brusco incremento que experimenta la parte imaginaria de  $k_{spp}$ , el MA es absorbido rápidamente por el metal disminuyendo notablemente la distancia de propagación.

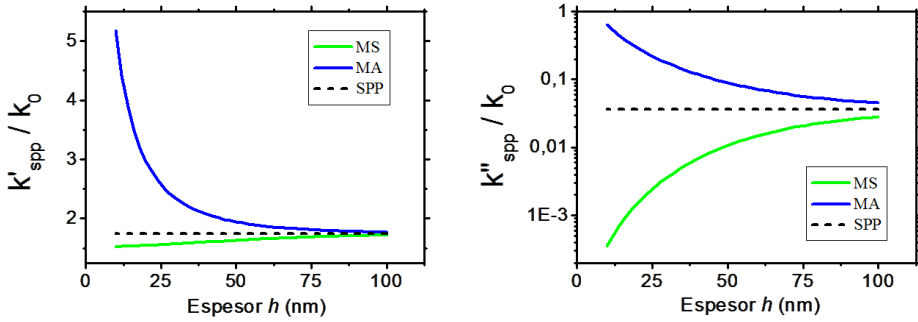


Figura 11 – Componentes real (izquierda) e imaginaria (derecha) del  $k_{spp}$  generado en una capa metálica de oro de espesor finito  $h$  y estructura simétrica. La línea discontinua representa el valor del  $k_{spp}$  de una única interfase formada por los mismos medios.

### 2.2.2. Estructura asimétrica

Si los medios dieléctricos a cada lado de la capa metálica presentan índices de refracción distintos (ver Figura 10-b)), el comportamiento y distribución del campo electromagnético de los modos cambia. Cuando la capa metálica es lo suficientemente gruesa, es posible excitar dos plasmones independientes, uno en cada cara, cuya relación de dispersión será distinta para cada modo. Se denomina *modo de índice inferior* (MII) al modo excitado en la interfase del metal y la capa de índice de refracción más bajo, caracterizado por tener el máximo de campo electromagnético en esta interfase. Mientras, el modo excitado en la interfase del metal y la capa de alto índice de refracción (denomina *modo de índice superior*, MIS) posee el máximo del campo en dicha interfase. La Figura 12 muestra las componentes real e imaginarias del vector de ondas del SPP en el caso concreto de que  $\lambda = 633 \text{ nm}$ , la lámina metálica sea de Au ( $\epsilon_{Au} = -11.79 + 1.25 \cdot i$ ) y esté flanqueada por un dieléctrico con un índice de refracción  $n_{d1} = 1.33$  (denominado medio de índice inferior) y por otro dieléctrico con  $n_{d2} = 1.52$  (denominado medio de índice superior). Al igual que en el caso en que los índices de refracción de los dieléctricos son iguales, estos modos se comportan de diferente forma al disminuir el espesor del metal. Así, se puede observar que a medida que disminuye el espesor  $h$  de la capa metálica, tanto el valor real como el imaginario de la  $k_{spp}$  del MII disminuye y, por lo tanto, tiende a extender el campo electromagnético en el medio dieléctrico de más alto índice [80], reduciendo la absorción y permitiendo la propagación a lo largo de mayores distancias. Sin embargo, a diferencia del MS, el MII presenta un **espesor de corte** a partir del cual el modo deja de estar guiado. Una vez sobrepasado este espesor de corte, el SPP se convierte en una onda plana en una situación de

reflexión interna total. Por otro lado, a medida que disminuye el espesor de la capa metálica, el MIS tiende a concentrar el campo electromagnético en el metal, aumentando rápidamente su absorción, al igual que ocurre en el modo asimétrico.

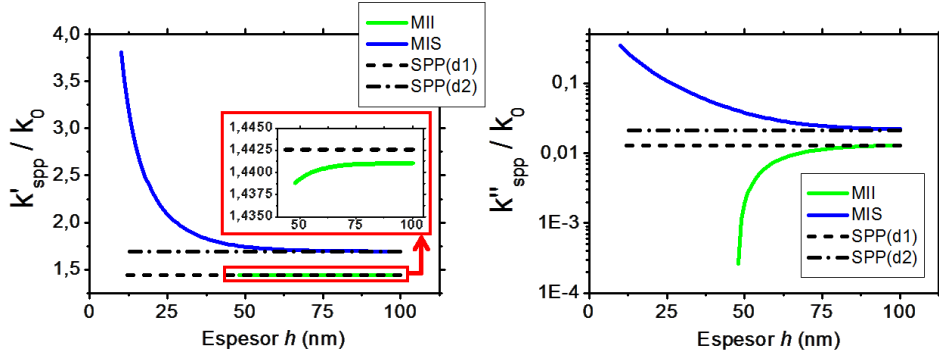


Figura 12 – Componentes real (izquierda) e imaginaria (derecha) del  $k_{spp}$  generado en una capa metálica de oro de espesor finito  $h$  y estructura asimétrica. Las líneas discontinuas representan los valores de  $k_{spp}$  asociados a una única interfase formada por oro y el medio dieléctrico de menor índice de refracción (d1) y por oro y el medio dieléctrico de mayor índice de refracción (d2).

## 2.3. Métodos de excitación

Tras comprobar que bajo ciertas condiciones es posible guiar luz en la interfase entre dos medios, surge la necesidad de analizar la forma en que los *modos plasmónicos* podrían ser excitados. En física, el término resonancia hace referencia al estado de un sistema en el cual se produce una vibración anormalmente grande en respuesta a un estímulo externo, producido cuando la frecuencia del estímulo es igual (o casi igual) que la frecuencia propia del sistema. En el caso de la excitación mediante luz de SPP (oscilaciones colectivas de electrones libres en la interfase plana entre dos medios cuyas constantes dieléctricas poseen partes reales de signos opuestos), la resonancia se consigue al igualar la parte real del vector de ondas del SPP con la componente paralela a la interfase del vector de ondas de la luz incidente. Según el sistema de coordenadas de la Figura 13, la **condición de excitación del SPP** será:

$$|k_z^{luz}| = |k_{spp}| \quad (24)$$

Se puede demostrar fácilmente que no es posible excitar un SPP incidiendo con una onda plana con polarización TM directamente sobre la interfase metal/dieléctrico. En esta situación (ver Figura 13), la componente paralela del vector de ondas de la luz vendrá dada por:

$$k_z^{luz} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon_d} \sin \theta \quad (25)$$

donde  $\theta$  es el ángulo de incidencia y  $\lambda$  la longitud de onda de la luz. De esta forma, sustituyendo valores típicos de  $\varepsilon_d$  y  $\varepsilon_m$  (por ejemplo, usando oro o plata como metales y, aire o agua como dieléctrico) en las ecuaciones ( 15 ) y ( 25 ), se obtiene que para esta configuración:

$$|k_z^{luz}| < |k_{spp}| \quad (26)$$

con independencia del valor del ángulo de incidencia y de la longitud de onda de la luz empleada (dentro del rango de frecuencias en el que  $\varepsilon'_m < 0$ ). Por lo tanto, queda descartada la posibilidad de excitar el SPP incidiendo directamente sobre la interfase con una onda plana a través del medio dieléctrico que forma dicha interfase.

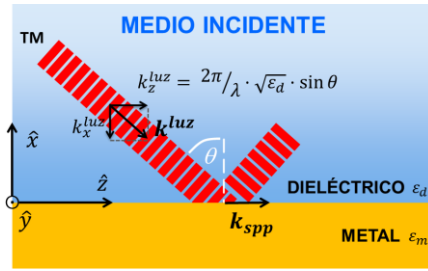


Figura 13 – Situación de no-excitación del SPP.

Este hecho también puede ser deducido a través del análisis de la relación de dispersión  $\omega(k)$  del SPP generado en la interfase entre un medio metálico y un dieléctrico. Por simplicidad se supondrá que el metal no posee absorción, y que por lo tanto  $\varepsilon_m(\omega) = \varepsilon_0 \cdot (1 - \omega_p^2/\omega^2)$ . De esta forma, sustituyendo  $\varepsilon_m(\omega)$  en la ecuación ( 15 ) será sencillo obtener las relaciones de dispersión del SPP generado en una interfase  $\varepsilon_d/\varepsilon_m(\omega)$ . La Figura 14-a) muestra la relación de dispersión del SPP generado en dicha interfase, quedando claramente delimitadas las regiones de guiado, radiación y semi-radiación.

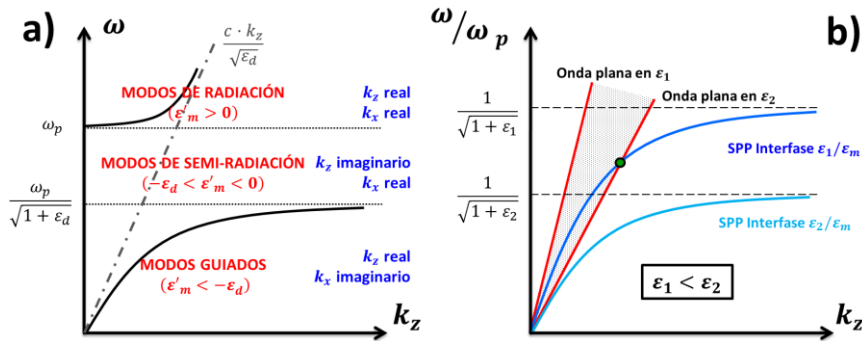


Figura 14 – (a) Relación de dispersión  $\omega(k)$  del SPP en una interfase metal/dieléctrico. En (b) se muestra, suponiendo que el metal está formado por un gas de electrones libres sin absorción, la  $\omega(k)$  para dos constantes dieléctricas distintas  $\varepsilon_1$  y  $\varepsilon_2$ . En este último caso, estas relaciones se comparan con las relaciones de dispersión de una onda plana propagándose en los mismos dieléctricos (líneas rectas).

En la Figura 14-b) se observa cómo las relaciones de dispersión de una onda plana que se propaga por un dieléctrico y la del SPP que puede ser generado en una interfase entre un metal y ese mismo medio dieléctrico, nunca se igualan. En general, esto quiere decir que para poder excitar el SPP mediante luz, se necesita aumentar el valor del vector de ondas de la luz incidente.

Existen diferentes técnicas que permiten aumentar el  $k_x^{luz}$  y por lo tanto, acoplar luz incidente con el plasmón superficial. Las más utilizadas para aplicaciones biosensoras son el método de reflexión interna total frustrada [81] y el acoplamiento mediante red de difracción [82]. Otro método menos empleado, pero muy importante ya que permite aunar óptica integrada y plasmones superficiales, es el acoplamiento de luz desde una guía de ondas [83]. Otras alternativas menos empleadas son: el acoplamiento mediante la intensa focalización de un haz [84] o mediante el empleo de técnicas de microscopia de campo cercano [85].

### 2.3.1. Excitación mediante reflexión interna total frustrada

Esta técnica, también conocida como *acoplamiento por prisma*, admite dos configuraciones: la configuración de Otto [68] y la configuración Kretschmann [69] (ver Figura 15). Este sencillo método de excitación se caracteriza por emplear un prisma con una constante dieléctrica  $\varepsilon_p > \varepsilon_d$  para así aumentar el valor del vector de ondas de la luz incidente hasta poder igualar el valor de  $k_{spp}$ . A pesar de que ambas configuraciones están basadas en el mismo principio, existen diferencias importantes entre ellas.

- Configuración de Otto

En esta configuración, un prisma con constante dieléctrica  $\varepsilon_p > \varepsilon_d$  se sitúa a una distancia  $q$  de la interfase metal/dieléctrico (ver Figura 15-a)). Tras hacer incidir un haz en la interfase prisma/dieléctrico a un ángulo  $\theta$  mayor que el ángulo crítico  $\theta_c$ <sup>8</sup> se generará una onda evanescente perpendicular a las interfases. Si la distancia entre el prisma y la interfase se selecciona adecuadamente (típicamente alrededor de los 200-300 nm) el campo evanescente y el plasmón superficial se acoplarán, generándose un SPP. Por el contrario, si la distancia  $q$  fuese mayor que la distancia de penetración del campo evanescente, éste último no podrá acoplarse al SPP. Con este método, en el caso de que el medio metálico tenga un espesor  $h \ll L_m$  y la lámina metálica se encuentre flanqueada por dos medios dieléctricos, será posible excitar los modos simétrico y asimétrico de una capa metálica delgada en un sistema simétrico, así como el MII y el MIS de un sistema asimétrico (descritos en el apartado 2.2), siempre y cuando el índice de refracción del prisma sea mayor que el de estos medios dieléctricos.

---

<sup>8</sup>  $\theta_c$ , ángulo al que se produce la reflexión interna total en la interfase prisma/dieléctrico, determinado por  $\theta_c = \arcsin(\sqrt{\varepsilon_d}/\sqrt{\varepsilon_p})$ .

- Configuración de Kretschmann

En esta configuración, la utilizada durante esta tesis, un prisma con constante dieléctrica  $\varepsilon_p$  se pone en contacto con una lámina metálica de espesor  $h$ . En el otro extremo de esa lámina se encuentra un medio dieléctrico con constante dieléctrica  $\varepsilon_d$ , siendo  $\varepsilon_p > \varepsilon_d$  (ver Figura 15-b)). Si la lámina metálica es lo suficientemente delgada ( $h < 100 \text{ nm}$  para  $\lambda$  pertenecientes al espectro visible e infrarrojo cercano), el haz incidente podrá penetrar hasta la interfase metal/dieléctrico y acoplarse al SPP soportado por esta estructura. En esta configuración únicamente es posible excitar el MII del sistema asimétrico formado por el sistema prisma/metal/dieléctrico, ya que (como se puede deducir de la Figura 12) el valor de  $|k_{spp}^{MIS}/k_0| > \sqrt{\varepsilon_p}$  independientemente del ángulo de incidencia y por lo tanto, nunca podrá alcanzarse la condición de excitación del SPP del MIS.

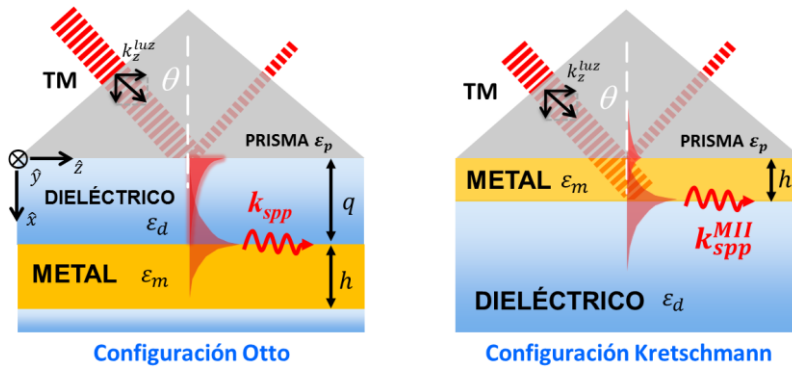


Figura 15 – Excitación del SPP mediante acoplamiento por prisma. Esquemas de las configuraciones de acoplamiento: configuración de Otto (izquierda) y Kretschmann (derecha).

En el caso del acoplamiento mediante prisma, la componente paralela del vector de ondas de la luz vendrá dada por:

$$k_z^{luz} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\varepsilon_p} \sin \theta \quad (27)$$

Como se vio en el apartado 2.2 de este capítulo, el vector de onda del plasmón superficial soportado por una capa metálica delgada flanqueada por dos dieléctricos posee una fuerte dependencia con el espesor de la lámina de oro. Por esta razón, el  $k_{spp}$  de este tipo de sistemas será de la forma:

$$k_{spp} = k_{spp}^0 + \Delta\beta = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} + \Delta\beta \quad (28)$$

donde  $k_{spp}^0$  es el vector de ondas del SPP en una interfase metal/dieléctrico formada por medios semi-infinitos (ecuación (15)) y el término  $\Delta\beta$  representa la variación que experimenta  $k_{spp}^0$  como resultado de la interacción entre los modos plasmónicos

soportados por las dos interfases. Al igual que  $k_{spp}^0$ , el término  $\Delta\beta$  es complejo ( $\Delta\beta = \Delta\beta' + i \cdot \Delta\beta''$ ), de tal forma que su parte real ( $\Delta\beta'$ ) modificará la condición de excitación del SPP, y la imaginaria  $\Delta\beta''$  contribuirá a la parte de absorción asociada al SPP. De esta forma se tiene que, en función de sus componentes reales e imaginarias, el vector de ondas del SPP será:

$$k_{spp} = (Re(k_{spp}^0) + \Delta\beta') + i \cdot (Im(k_{spp}^0) + \Delta\beta'') \quad (29)$$

En el caso de la configuración de Kretschmann (ocurre algo equivalente en la configuración de Otto), es obvio que  $\Delta\beta$  ha de depender del espesor  $h$  para que así, cuando  $h \rightarrow \infty$  (caso en el que el medio metálico puede ser considerado semi-infinito)  $\Delta\beta$  se anule y  $k_{spp} \rightarrow k_{spp}^0$ . Según esto, la condición de excitación de la configuración de Kretschmann será de la forma:

$$|k_{spp}| = |k_{spp}^0(\epsilon_m, \epsilon_d)| + |\Delta\beta| \equiv |k_z^{luz}| = k_0 \cdot \sqrt{\epsilon_p} \cdot \sin(\theta) \quad (30)$$

Sin embargo, tal como se demostró en la Figura 12, la parte real del vector de ondas del MII es prácticamente igual que la del vector de ondas de un SPP. De esta forma, en una primera aproximación, el término  $\Delta\beta$  podrá ser despreciado a la hora de determinar la condición de excitación en configuración de Kretschmann.

### 2.3.2. Excitación mediante red de difracción

Otro método usualmente empleado para la excitación del SPP es a través del empleo de redes de difracción. Al generar una estructura periódica, como una rejilla, sobre la lámina metálica, la luz incidente es difractada por dicha estructura periódica y el vector de ondas de los haces difractados ( $k_x^n$ ) vendrá expresado por:

$$k_x^n = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin(\theta) + n \cdot \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (31)$$

donde  $\Lambda$  es el período de la estructura (el cual ha de ser del orden de la longitud de onda incidente) y  $n$  es el número de orden de difracción de la luz (ver Figura 16).

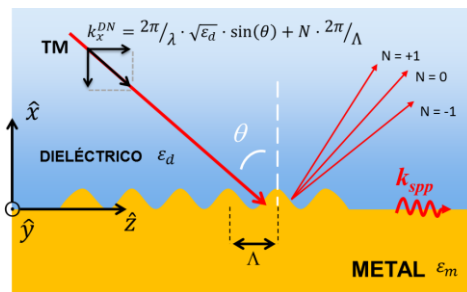


Figura 16 – Esquema de excitación del SPP mediante una red de difracción.

Controlando el ángulo de incidencia de la luz y el período de la red de difracción será posible alcanzar la condición de resonancia del SPP para un orden de difracción en concreto. A diferencia del método Kretschmann, en este método de excitación el espesor de la capa metálica no es un parámetro relevante. En cambio, en esta configuración, el período y profundidad de las estructuras periódicas diseñadas, serán claves para la óptima excitación del SPP.

### 2.3.3. Excitación mediante luz guiada

El índice efectivo de un modo guiado depende del índice de refracción y de los espesores de las capas que forman la guía de ondas. En el caso de guías planas (ver Figura 17), si se deposita una capa metálica delgada sobre la guía de ondas y se controlan los espesores e índices de refracción de las capas de esta guía, es posible conseguir un modo guiado cuyo índice efectivo satisfaga la condición de resonancia de SPP de la capa metálica. Cuando esto ocurra, se producirá una transferencia de energía desde el modo guiado al modo plasmónico. Dentro de este esquema de excitación, los modos guiados pueden provenir de guías de ondas planas, acanaladas o de fibras ópticas.

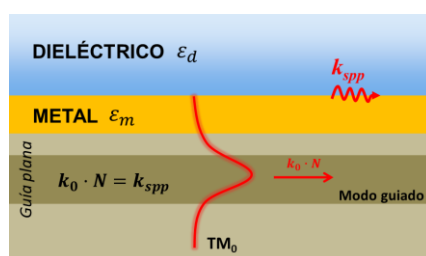


Figura 17 – Esquema de excitación del SPP mediante luz guiada.





# Capítulo 3

## ANÁLISIS DEL BIOSENSOR SPR

*“Si les hubiera preguntado a mis clientes lo que querían,  
me habrían dicho: un caballo más rápido”*

HENRY FORD

---

La distancia de propagación de los SPP puede ir desde los cientos de nanómetros hasta los milímetros, lo cual hace que este fenómeno sea de gran utilidad para la creación de circuitos fotónicos capaces de operar a frecuencias ópticas [86]. Otra extraordinaria cualidad, con importantes aplicaciones prácticas, es la gran intensidad de los campos electromagnéticos generados en las proximidades de la interfase [87]. También muy importante es la capacidad de los plasmones superficiales de confinar energía óptica en regiones inferiores a la longitud de onda de la luz, venciendo así los límites de difracción establecidos para la Óptica convencional [88]. Pero sin duda, la cualidad que con mejores resultados se ha explotado hasta ahora es la gran dependencia del vector de ondas del SPP con el índice de refracción del medio dieléctrico. La importante dependencia de  $k_{spp}$  con el índice de refracción del medio dieléctrico ha permitido la generación de un tipo de biosensores ópticos, denominados biosensores de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) [80,89]. Este tipo de biosensor plasmónico se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de interacciones bio-específicas. Los biosensores SPR permiten llevar a cabo el seguimiento de interacciones moleculares en tiempo real, proporcionando información sobre: la especificidad de la interacción, que está relacionada con el grado de unión de diferentes parejas de moléculas; la cinética y la afinidad de la interacción, mediante el estudio de la velocidad y niveles de la unión en relación a modelos de interacción; la concentración de moléculas presentes en la muestra, que se relaciona con el nivel de respuesta. Otra notable cualidad de los biosensores SPR es su capacidad para

detectar reacciones de reconocimiento en un intervalo muy amplio de pesos moleculares, velocidades de unión y de afinidad [90]. Además, en este tipo de biosensores, el análisis de interacciones moleculares puede llevarse a cabo en un extenso intervalo de condiciones químicas y ambientales. En función de la medida que se persiga, se podrán emplear diferentes temperaturas, fuerzas iónicas o pH. De esta manera, el análisis de la cinética y termodinámica de la unión puede proporcionar una comprensión única de los mecanismos de las reacciones. Los usos o aplicaciones de los biosensores SPR pueden dividirse en dos áreas generales: *Caracterización de interacciones biomoleculares* y *Cuantificación de especies químicas y biológicas*. Estos dispositivos se han aplicado en diferentes campos como el diagnóstico clínico, el control medioambiental, la industria alimentaria y la seguridad ciudadana.

La primera aplicación como biosensor de la *Resonancia de Plasmón Superficial* tuvo lugar en 1983 [91]. Anteriormente, los SPP se habían empleado para el estudio de las propiedades superficiales de los metales [92,93], para el estudio de las constantes ópticas de capas orgánicas [94] y para la detección de gases [95]. Debido al enorme potencial que presentaba este tipo de sensores, en 1986, la compañía sueca *Pharmacia* creó una división (*Pharmacia Biosensor*) para el desarrollo de dispositivos biosensores basados en esta nueva tecnología. El trabajo concluyó con el lanzamiento en 1990 del primer biosensor SPR comercial, bautizado como *BIAcore*. Desde entonces, la técnica de SPR se ha convertido en un método de referencia, publicándose miles de trabajos en revistas científicas y comercializándose decenas de biosensores SPR por varias compañías de todo el mundo.

### 3.1. Principio de funcionamiento

El principio de funcionamiento de los sensores SPR se basa en la dependencia que  $k_{spp}$  posee respecto al índice de refracción del medio dieléctrico que forma la interfase por la que se propaga el SPP, y en la posibilidad que brinda el receptor biológico de generar un cambio local de índice de refracción en las proximidades de dicha interfase como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular. Esta dependencia permite estudiar las características superficiales de los metales, pero además y más importante, permite utilizar los SPP como “sondas” con las que determinar las variaciones de índice de refracción del medio dieléctrico producidas en las proximidades (varios cientos de nanómetros para una interfase oro/agua) de la superficie metálica.

De entre las distintas configuraciones de excitación del SPP existentes, destaca sobre todo la **configuración de Kretschmann** por ser idónea para detectar los cambios producidos en el medio dieléctrico. En esta configuración, el haz incidente (la onda evanescente que excita el SPP) no atraviesa el medio dieléctrico y por lo tanto, no se verá afectada por este medio. Por esta misma razón, la configuración de Otto y la excitación mediante red de difracción son técnicas más idóneas para el estudio de las propiedades superficiales de los metales, precisamente por excitar el SPP a través del medio dieléctrico. A pesar de esto, existen diferentes dispositivos biosensores basados en estas dos últimas técnicas de excitación que han

demostrado ser eficientes [96,97]. Sin embargo, estos dispositivos son menos versátiles que los basados en la configuración de Kretschmann. Además, la configuración de Kretschmann es un sistema práctico y simple que emplea componentes ópticos convencionales y puede combinarse con diferentes modos de detección. De ahí que haya sido el método de excitación de plasmones superficiales empleado durante esta tesis doctoral y por lo tanto, será la configuración empleada en todos los cálculos o análisis realizados.

### 3.1.1. Ángulo y longitud de onda de excitación

En todo fenómeno de excitación se produce una transferencia de energía. En el caso de la *Resonancia de Plasmón Superficial*, la energía del fotón incidente es transferida a la onda de densidad de carga. Como se vio anteriormente, dicha transferencia de energía se produce cuando la componente paralela a la interfase del vector de ondas de la luz incidente iguala al vector de ondas del SPP (*condición de excitación del SPP*).

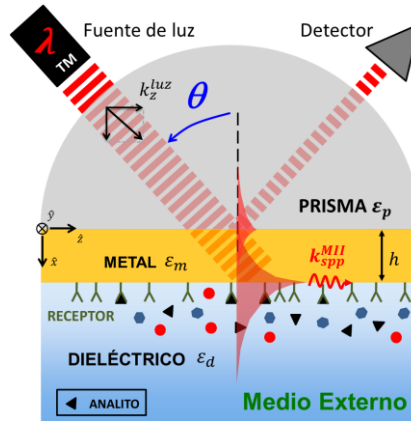


Figura 18 – Esquema de un biosensor SPR basado en acoplamiento por prisma mediante configuración de Kretschmann.

En el caso de la configuración de Kretschmann (ver Figura 18) dicha condición viene dada por la ecuación ( 30 ). De esta forma, la condición de excitación del SPP se cumplirá para ternas de valores  $(\theta, \lambda \text{ y } h)$ . Sin embargo, si asumimos que  $|\epsilon'_m| \gg |\epsilon''_m|$  y que  $|k_{spp}| \approx |k_{spp}^{MII}|$  (como se vio en la ecuación ( 19 ) y en la Figura 12, respectivamente), el término  $\Delta\beta$  puede ser despreciado, obteniéndose con ello la condición de excitación aproximada de la configuración de Kretschmann:

$$\sqrt{\frac{\epsilon'_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} = \sqrt{\epsilon_p} \cdot \sin(\theta) \quad (32)$$

De esta ecuación se deduce que, seleccionando apropiadamente el índice de refracción del prisma, existirán pares de valores  $(\theta, \lambda)$  para los cuales se cumplirá la condición de excitación del SPP, y la luz reflejada sufrirá una fuerte atenuación como consecuencia de la transferencia de energía. Como se puede observar en la Figura 19,

para un haz incidente de luz monocromática y *p*-polarizado, existirá un ángulo (y sólo uno) para el cual se cumplirá la igualdad indicada en la ecuación ( 32 ). Dicho ángulo se denomina **ángulo de excitación del SPP** y se denota como  $\theta_{spp}$ . Como consecuencia del acoplamiento entre el haz incidente y el plasmón superficial, la energía del haz incidente es transmitida al SPP y la reflectancia al ángulo de excitación del SPP sufrirá una fuerte atenuación. De igual forma, en el caso de incidir con luz policromática *p*-polarizada, si lo que se fija inicialmente es el ángulo de incidencia, entonces existirá una única longitud de onda, denominada **longitud de excitación del SPP** ( $\lambda_{spp}$ ), para la cual se excitará el SPP, observándose una fuerte atenuación de la intensidad de luz reflejada a esa longitud de onda. De esta forma, la ecuación ( 32 ) permite determinar el ángulo o la longitud de onda de excitación aproximada del método de excitación basado en el acoplamiento por prisma. En los casos en los que el término  $\Delta\beta$  no pueda ser despreciado, y  $\lambda = cte$ , la componente real de  $\Delta\beta'$  generará un pequeño desplazamiento en el ángulo de excitación  $\theta_{spp}$  respecto al determinado a través de la ecuación ( 32 ), mientras que en el caso de que  $\theta = cte$ , lo que se produce es un desplazamiento similar en  $\lambda_{spp}$ .

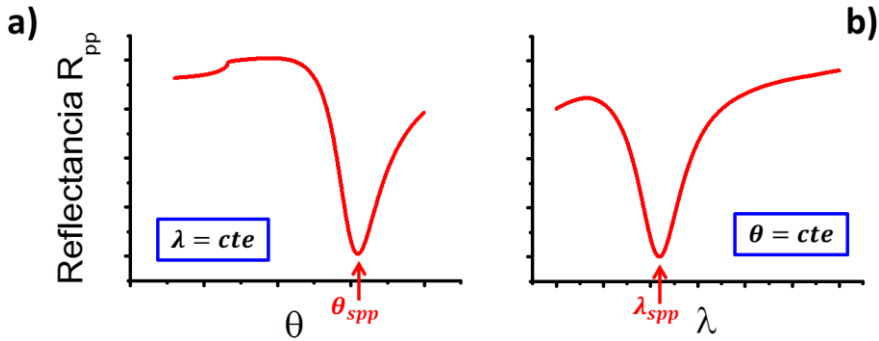


Figura 19 – Curvas representativas de: (a) la resonancia angular y (b) espectral producida en configuración de Kretschmann.

Finalmente, como se puede observar en la Figura 20, la ecuación ( 32 ) permite calcular la relación entre la longitud de onda y el ángulo de excitación; es decir, la longitud de onda a la que se produce la excitación del SPP para un ángulo de incidencia concreto y viceversa. En este cálculo se supuso oro como medio metálico (con las constantes ópticas indicadas en el Apéndice A) agua como medio dieléctrico ( $n_d = 1,33 \text{ RIU}$ ) y vidrio como material del que está compuesto el prisma ( $n_p = 1,52 \text{ RIU}$ ). La figura muestra que dicha relación no es lineal y que existe un ángulo y una longitud de onda límites a las que se puede excitar el SPP. En el caso analizado, interfase oro/agua, el  $\theta_{spp}$  y  $\lambda_{spp}$  límites son respectivamente,  $62^\circ$  y  $550 \text{ nm}$ . El límite angular se debe a la pérdida de la condición de reflexión interna total, mientras que el límite espectral es debido a la aparición de transiciones interbanda, la cual conlleva un gran aumento de la absorción óptica del oro.

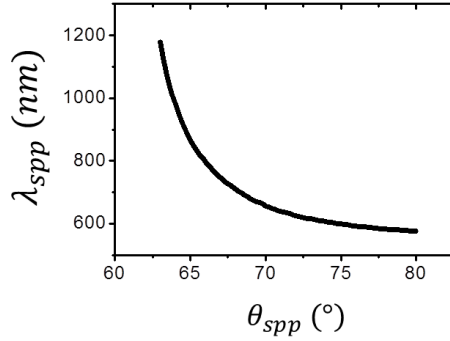


Figura 20 – Relación entre la longitud de onda y el ángulo de excitación del SPP de la geometría indicada en la Figura 32 para dos espesores distintos de la capa de Au.

### 3.1.2. Variación del índice de refracción del medio dieléctrico

De la ecuación ( 32 ) se deduce que la condición de excitación del SPP en la configuración de Kretschmann depende del valor de la constante dieléctrica del medio dieléctrico (también denominado **medio externo**). De ahí que resulte interesante analizar la dependencia del vector de ondas del SPP y, por lo tanto, de la condición de excitación, con el índice de refracción del medio externo. En este punto conviene recordar que en la configuración de Kretschmann (estructura asimétrica) únicamente es posible excitar el MII de la estructura asimétrica formada por el prisma/metal/dieléctrico, por lo que al restringir el análisis a dicho método de excitación no será necesario calcular el MIS.

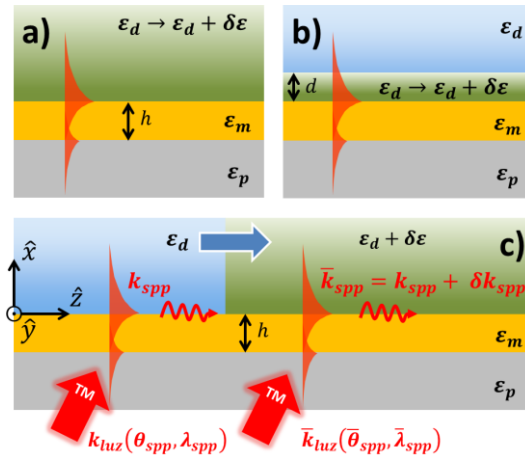


Figura 21 – (a) Cambio de índice de refracción volumétrico y (b) superficial del medio externo. (c) Esquema general del Principio de funcionamiento de un sensor SPR basado en la configuración de Kretschmann (geometría y notación empleada).

En esta sección se analizan dos posibles situaciones. Por un lado, un cambio volumétrico homogéneo de todo el índice de refracción del medio dieléctrico (ver Figura 21-a)) y por otro, un cambio superficial homogéneo producido por una capa delgada de espesor  $d$  (ver Figura 21-b)), siendo el espesor  $d$  inferior a la distancia de

penetración del campo electromagnético en el medio dieléctrico. Según la notación indicada en la Figura 21-c), la variación del vector de ondas del SPP producida por la alteración de la constante dieléctrica del medio dieléctrico, denotada como  $\delta k_{spp}$ , será de la forma:

$$\delta k_{spp} = k_{spp} - \bar{k}_{spp} \quad (33)$$

### 3.1.2.1. Cambio de índice de refracción volumétrico

Desde un punto de vista teórico, la variación que experimenta el  $k_{spp}$  como consecuencia de la alteración del índice de refracción del dieléctrico puede ser analizada gracias a la teoría de perturbación de las guías de onda [98]. El análisis de la perturbación del vector de ondas de los plasmones superficiales excitados en capas metálicas delgadas (apartado 2.2) no admite solución analítica y ha de ser analizado de forma numérica. De esta forma, bastará con resolver de forma numérica la ecuación de ondas ( 2 ) para el perfil de índice de refracción deseado y para dos constantes dieléctricas del medio externo ( $\varepsilon(x)$  y  $\bar{\varepsilon}(x) = \varepsilon(x) + \delta\varepsilon$ ), calculando así la variación que experimenta  $k_{spp}$  como consecuencia de  $\delta\varepsilon$ . En este caso, los perfiles de índice de refracción serán de la forma:

$$\varepsilon(x) = \begin{cases} \varepsilon_d & x \geq 0 \\ \varepsilon_m & -h \leq x \leq 0 \\ \varepsilon_p & x \leq -h \end{cases} \quad \bar{\varepsilon}(x) = \begin{cases} \varepsilon_d + \delta\varepsilon & x \geq 0 \\ \varepsilon_m & -h \leq x \leq 0 \\ \varepsilon_p & x \leq -h \end{cases} \quad (34)$$

La Figura 22 muestra el resultado obtenido para una configuración vidrio/oro/agua en función del espesor de la capa de oro, asumiendo  $n_p = 1,52$ ,  $n_d = 1,33$  y las  $\varepsilon_m$  indicadas en el Apéndice A. Como variación del índice de refracción del medio externo se tomó  $\delta n = 10^{-2}$  RIU y se realizó el cálculo para tres longitudes de onda incidente 633, 660 y 780 nm.

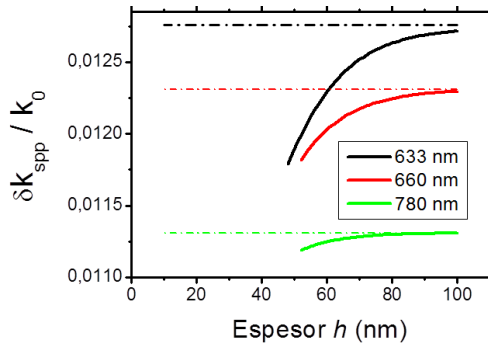


Figura 22 – Variación del vector de ondas del SPP ante un cambio de índice de refracción volumétrico del medio dieléctrico de un MII excitado en configuración de Kretschmann (líneas continuas) y del SPP de una única interfase metal/dieléctrico (líneas discontinuas).

Según se desprende del análisis de esta figura:

- La variación sufrida por el vector de ondas del  $k_{spp}$  como consecuencia de una variación volumétrica del índice de refracción del medio externo disminuye a medida que se reduce el espesor de la capa metálica. Esto se debe a que, según nos aproximamos al espesor de corte, el campo electromagnético tiende a extenderse en el prisma.
- En el caso del oro, la disminución de  $\delta k_{spp}$  con el espesor se hace menos acusada a medida que incrementamos la longitud de onda incidente. Así mismo, también se observa una disminución de la variación de  $\delta k_{spp}$  como consecuencia del aumento de la longitud de onda incidente.

Por simplicidad, viendo que el vector de ondas del MII (ver Figura 12) y la variación que este experimenta como consecuencia de  $\delta\epsilon$  (ver Figura 22) no difieren mucho en el caso de un MII y un SPP que se propaga en una única interfase metal/dieléctrico, se puede simplificar el análisis al caso de una interfase metal/dieléctrico. De esta forma, será posible obtener una expresión analítica para  $\delta k_{spp}$ , proporcionará una mejor comprensión del parámetro  $\delta k_{spp}$  y de su dependencia con las constantes dieléctricas de los medios involucrado. Bastará con evaluar la ecuación ( 15 ) para dos índices de refracción del medio dieléctrico diferentes  $\epsilon_d$  y  $\epsilon_d + \delta\epsilon$  para así poder determinar  $\delta k_{spp}$ . De esta forma, para pequeñas alteraciones de la constante dieléctrica del medio dieléctrico ( $|\epsilon_d| \ll |\delta\epsilon|$ ) se puede asumir que los campos modales permanecen iguales y el vector de ondas del SPP apenas variará  $|k_{spp} - \bar{k}_{spp}| \ll |k_{spp}|$ . Teniendo en cuenta esto,  $\delta k_{spp}$  puede desarrollarse hasta obtener que:

$$\delta k_{spp}|_{volumétrica} = k_{spp} - \bar{k}_{spp} = \frac{(k_{spp})^3}{2 \cdot k_0^2 \cdot \epsilon_d^2} \cdot \delta\epsilon \quad (35)$$

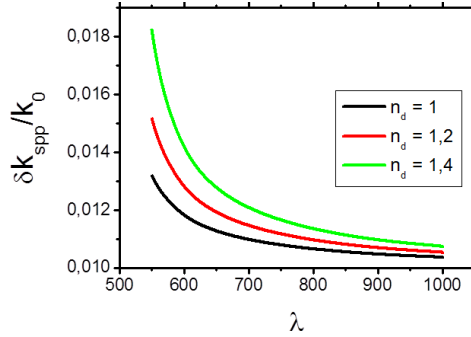
De esta forma, será posible reescribir la ecuación ( 33 ) en función del *índice de propagación efectivo del SPP*, usualmente denotado como  $N_{spp}$ . Así se tendrá que:

$$(\delta k_{spp}/k_0)_{volumétrico} = \left( \frac{N_{spp}}{n_d} \right)^3 \cdot \delta n \quad (36)$$

donde  $N_{spp} = k_{spp}/k_0$  y  $\delta\epsilon = 2 \cdot n_d \cdot \delta n$ . Si además se tiene en cuenta que, en el rango visible, los metales nobles (como el oro o la plata) con  $|\epsilon'_m| < \epsilon_d$  poseen una componente imaginaria de la constante dieléctrica mucho menor que su parte real  $|\epsilon'_m| \gg |\epsilon''_m|$  (ver Apéndice A) y además, se desprecia la absorción del dieléctrico, la ecuación ( 36 ) puede simplificarse hasta obtener que:

$$(\delta k_{spp}/k_0)_{\text{volumétrico}} \approx \left( \frac{\varepsilon'_m}{\varepsilon'_m + \varepsilon_d} \right)^{3/2} \cdot \delta n \quad (37)$$

La Figura 23 muestra el resultado de resolver la ecuación (37) en función de la longitud de onda; en el caso de una interfase oro/dieléctrico, distintos valores de  $n_d$  y asumiendo las constantes ópticas indicadas en el Apéndice A. Como variación del índice de refracción del medio externo se tomó  $\delta n = 0,01$ .



**Figura 23 – Variación del vector de ondas del SPP de una única interfase metal/dieléctrico ante un cambio de índice de refracción volumétrico del medio dieléctrico de  $10^{-2}$  RIU para tres valores diferentes de  $n_d$  (1, 1.2 y 1.4 RIU).**

Según se deduce de la figura anterior,  $\delta k_{spp}$  disminuye a medida que se incrementa la longitud de onda, mientras que esa variación se incrementa de forma proporcional con el valor del índice de refracción del medio externo.

### 3.1.2.2. Cambio de índice de refracción superficial

Las expresiones anteriormente calculadas se corresponden con la variación del  $k_{spp}$  ante un cambio de índice de refracción volumétrico; es decir, en todo el medio. Sin embargo, en las aplicaciones biosensoras los cambios de índice de refracción debidos a la reacción de reconocimiento se producen únicamente en una región próxima a la superficie metálica (ver Figura 21-b)). Por lo tanto, únicamente una parte de la onda evanescente interactuará con la capa biológica. La fracción del campo evanescente empleada en la detección depende del tamaño del analito, y de la intensidad y distancia de penetración del campo electromagnético. Dado el carácter evanescente del campo electromagnético que actúa como “sonda” a ambos lados de la interfase por la que se propaga el SPP, en el caso de que el cambio de índice de refracción del medio dieléctrico se produzca en una región de espesor mucho mas pequeña que la distancia de penetración del dieléctrico ( $d \ll L_d$ ) y próxima a la interfase, el  $\delta k_{spp}$  experimentado por un cambio de índice de refracción superficial será proporcional al espesor  $d$  y siempre menor que el experimentado por un cambio de índice de refracción volumétrico. Sin embargo, la dependencia espectral exhibida en la Figura 23 seguirá siendo válida para esta situación. Ambos parámetros,  $\delta k_{spp}$  volumétrico y superficial, se igualarán cuando el espesor  $d$  abarque la longitud total del campo evanescente en el medio dieléctrico. A la hora de emplear los SPP como



sondas para la detección de analitos ha de tenerse en cuenta el tamaño de estos, y adecuar  $L_d$  al tamaño del analito.

### 3.1.3. Variación de la condición de excitación del plasmón superficial

Según la condición de excitación deducida para la configuración de Kretschmann (ecuación (32)), cualquier variación en el vector de ondas del plasmón superficial ( $\delta k_{spp}$ ) como consecuencia de la variación de la constante dieléctrica ( $\epsilon_d + \delta\epsilon$ ), provocará una variación  $(\theta_{spp}, \lambda_{spp}) \rightarrow (\bar{\theta}_{spp}, \bar{\lambda}_{spp})$  en los valores a los cuales se produce la transferencia de energía entre los fotones incidentes y el SPP (ver Figura 21). Por lo tanto, cualquier variación  $\delta\epsilon$  podrá ser determinada a través de la modificación que esta produce en la condición de excitación del SPP. En concreto, como indica la Figura 24, cuando se incide con un haz monocromático ( $\lambda = cte$ ) se observará un desplazamiento del ángulo de excitación del SPP ( $\delta\theta_{spp} = \bar{\theta}_{spp} - \theta_{spp}$ ), mientras que si se incide con luz policromática a un ángulo fijo ( $\theta = cte$ ), lo que se observará es un desplazamiento de la longitud de onda de excitación ( $\delta\lambda_{spp} = \bar{\lambda}_{spp} - \lambda_{spp}$ ) como consecuencia de la alteración  $\delta\epsilon$  del índice de refracción del medio dieléctrico. Estos desplazamientos podrían ser utilizados para cuantificar la variación  $\delta\epsilon$  experimentada en las proximidades de la interfase metal/dieléctrico.

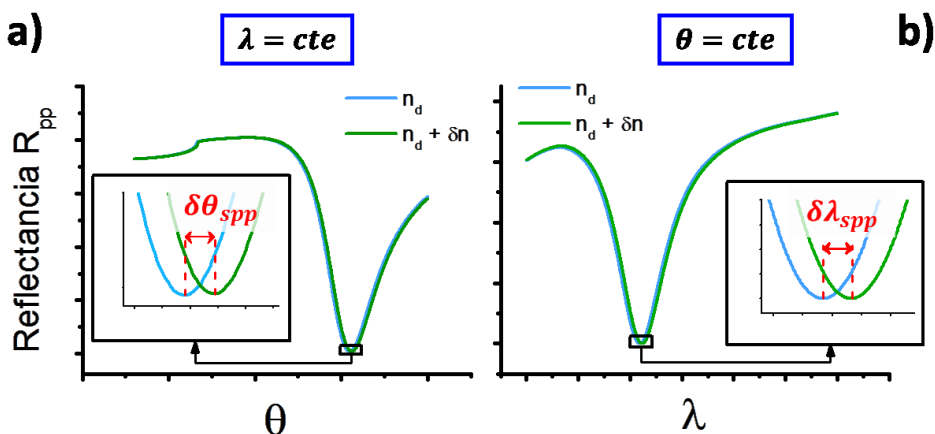


Figura 24 – Esquema de: (a) la variación del ángulo de excitación del SPP de la curva angular de resonancia y (b) la variación de la longitud de onda de excitación del SPP de la curva espectral de resonancia debida a un pequeño cambio  $\delta\epsilon$ .

## 3.2. Biosensor SPR

Resulta evidente que la aplicación directa del sensor SPR es la de actuar como refractómetro<sup>9</sup>. Sin embargo, el hecho de que la zona sensora de estos dispositivos

<sup>9</sup> Dispositivo que mide los índices o los cambios de índice de refracción del dieléctrico.

se localice justo en las proximidades de superficie del metal, convierte a este tipo de sensores en candidatos ideales para ser empleados como biosensores de afinidad. Recuérdese que, en esencia, un biosensor es un sensor en cuyo transductor se ha inmovilizado algún tipo de receptor biológico; de tal forma que el analito de interés puede unirse al receptor de forma selectiva. Así, si posteriormente a la inmovilización de biomoléculas específicas a un determinado analito, la superficie del metal inmovilizada es expuesta a ese analito, la interacción biomolecular que se produce entre el analito y el receptor generará una variación local del índice de refracción del dieléctrico. Dicha variación podrá ser detectada a través de la modificación que esta genera en la condición de excitación del SPP, permitiendo la creación de dispositivos sensores basados en este principio. De ahí que los dos elementos más importantes y a la vez diferenciados del biosensor SPR sean: el *transductor plasmónico* (por ser el que define las propiedades del plasmón superficial) y el *elemento de reconocimiento biológico* (por ser el encargado de lograr que el cambio de índice se produzca en las proximidades de la interfase).

### 3.2.1. Transductor plasmónico

La parte más importante de todo dispositivo sensor es su transductor. En el caso de los biosensores, el transductor será el encargado de convertir la reacción de reconocimiento molecular analito–bioreceptor en una señal cuantificable. La diferencia fundamental entre un sensor SPR y un biosensor SPR es que, en este último, se han inmovilizado moléculas bioreceptoras sobre la superficie del metal (el transductor). La lámina metálica además de poseer propiedades plasmónicas adecuadas ( $|\varepsilon'_m| < \varepsilon_d$  y  $|\varepsilon'_m| \gg |\varepsilon''_m|$ ), ha de ser lo más resistente posible ante la exposición a soluciones que puedan llegar a ser corrosivas (ácidas o básicas). Dentro de los metales, los metales nobles (Au, Pt, etc.) son ideales para ser utilizados como transductores, ya que su principal característica es la de ser químicamente inertes. De los diferentes metales nobles existentes, el oro (Au) es el que mejores propiedades plasmónicas posee (ver Apéndice A). Existe otro grupo de metales, denominados metales seminobles (Ag, Cu, Hg, etc.) cuya reactividad es baja, pero mayor que la de los metales nobles. Por esta razón, **el oro es el más empleado en aplicaciones biosensoras**, debido a su mayor resistencia; mientras que la plata es el candidato ideal para la fabricación de dispositivos plasmónicos, ya que posee una muy baja absorción óptica. Sin embargo, esto no ha impedido que se hayan empleado otros metales, combinaciones de metales o incluso aleaciones de estos, con diversos resultados [99–102]. Por ello, el estudio de las propiedades plasmónicas de los materiales es un área muy importante de la Plasmonica, sobre la que se publican numerosos artículos cada año.

Además de la importancia de optimizar el espesor del transductor plasmónico, existen otros dos aspectos destacables de su morfología: su rugosidad y su estabilidad (es decir, la adhesión entre la capa metálica y el sustrato sobre el que se deposita). Ambos parámetros tienen una notable influencia en las propiedades físicas del SPP y por lo tanto, en su capacidad para detectar los cambios producidos en el medio dieléctrico. Resulta obvio que si las propiedades plasmónicas de un transductor no son estables este carecerá de toda utilidad. Respecto a su rugosidad, si la interfase entre el metal y el dieléctrico es rugosa, se producirá cierta dispersión

en el SPP, la cual generará una componente de radiación de luz desde el SPP al medio dieléctrico. Como consecuencia de esta radiación, se producirá una disminución y un ensanchamiento de las curvas de reflectancia que afectarán significativamente a la capacidad de detección del biosensor SPR.

### 3.2.2. Receptor biológico

En un biosensor, el transductor, además de ser resistente, ha de ser funcionalizable; es decir, ha de permitir que sobre él se inmovilicen biomoléculas receptoras. El proceso de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie del transductor es uno de los aspectos fundamentales en estos dispositivos. La inmovilización ha de realizarse de manera que permita la obtención de una densidad superficial óptima de bioreceptores, evite a la vez la unión inespecífica de otras sustancias a la superficie y no afecte a la actividad biológica del elemento inmovilizado ni a las propiedades del transductor empleado. Es un proceso que depende de forma directa del tipo de material con que esté fabricado el transductor y de los grupos funcionales reactivos presentes en la biomolécula, a través de los cuales se puede llevar a cabo la reacción química de inmovilización.

Las biomoléculas pueden ser inmovilizadas en la superficie de oro mediante adsorción física, monocapas autoensambladas o mediante una matriz tridimensional, generalmente usando hidrogeles de dextrano carboximetilado. Las monocapas autoensambladas [103–105], conocidas como SAM (del inglés *self-assembled monolayers*) proporcionan un método excelente para la inmovilización del elemento de reconocimiento biológico debido a la sencillez y fiabilidad del proceso, su reproducibilidad, así como la flexibilidad que presentan para la incorporación de diferentes biomoléculas. Esto último permite que la monocapa puede ser diseñada para finalizar en grupos funcionales que permitan la posterior unión del receptor biológico mediante enlace covalente, permitiendo llevar a cabo la inmovilización de las biomoléculas con una densidad y orientación controlada. Gracias a la formación de una monocapa uniforme y compacta, se reduce la adsorción de moléculas inespecíficas y protege a las biomoléculas del contacto con la superficie. En los biosensores SPR, la SAM se forma sobre la superficie de oro generalmente mediante alcanotioles o disulfuros. Este tipo de moléculas presentan gran afinidad por el oro y se unen a él por quimisorción. Una vez unidos, se produce un ordenamiento y empaquetamiento debido a las fuerzas de Van der Waals entre sus cadenas alquílicas. El uso de alcanotioles de cadena larga, formados por cadenas de más de diez carbonos, produce SAM densas y ordenadas, de forma parecida a una estructura cristalina (ver Figura 25), mientras que los de cadenas más cortas producen estructuras menos ordenadas [106].

Los elementos de reconocimiento biológico más utilizados en biosensores SPR son los de afinidad, siendo los anticuerpos y las cadenas simples de ADN los que se han empleado con más frecuencia. En los últimos años se han producido grandes avances mediante la utilización de fragmentos de anticuerpos, péptidos y aptámeros. Finalmente, hay que destacar que, a pesar de que los biosensores SPR son dispositivos que determinan el analito de forma directa (sin ayuda de marcadores fluorescentes o de masa que modifiquen o alteren el analito), no proporcionan una

medida absoluta de la cantidad de analito detectada. Estos biosensores necesitan ser previamente calibrados. Tras obtener la respuesta sensora de este dispositivo a concentraciones conocidas de analito (es decir, la curva de calibrado), se podrá determinar por comparación la concentración de una cantidad desconocida de analito. Esto requiere que ambos, la curva de calibrado y el ensayo, se realicen estrictamente bajo las mismas condiciones.

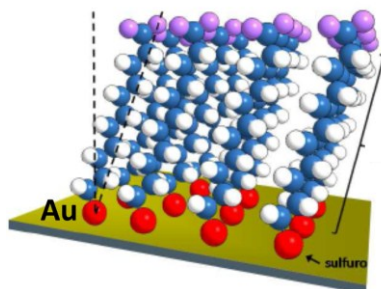


Figura 25 – Esquema de una SAM

### 3.3. Tipos principales de detección en biosensores SPR

Un biosensor SPR está compuesto, como mínimo, por tres elementos: una fuente de luz, una configuración óptica que permita excitar el SPP y un detector de luz. Los biosensores SPR se pueden agrupar y ordenar atendiendo a las características de cada uno de estos elementos. Si como método de excitación del SPP se utiliza el método de acoplamiento en configuración de Kretschmann, estos biosensores pueden ser clasificados (ver Figura 26) en función del tipo de fuente de luz que emplean (luz monocromática o policromática), o en función del sistema de detección de la luz que utilizan, (medida de la intensidad de luz reflejada, la longitud de onda o el ángulo de excitación, la fase o la polarización de la luz).

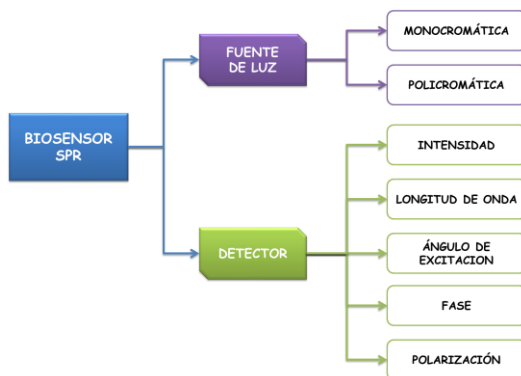


Figura 26 – Clasificación de los biosensores SPR basados en acoplamiento mediante prisma.

De los cinco principales métodos de detección empleados en los biosensores SPR basados en acoplamiento en configuración de Kretschmann, tres de ellos destacan principalmente: i) los basados en la medida de la intensidad de luz reflejada tras excitar el SPP, ii) la medida de las variaciones de la longitud de onda de resonancia cuando se fija el ángulo de incidencia y se incide con luz policromática, y iii) la medida de las variaciones del ángulo de resonancia cuando se usa una fuente de luz monocromática. Estas son las tres configuraciones más ampliamente empleadas y en las que se basan la práctica totalidad de los dispositivos comerciales actuales. A pesar de las diferencias en la detección, estos tres tipos de biosensores SPR poseen un esquema general común formado por una fuente de luz con polarización TM, mono o policromática según el caso; un prisma, el cual puede ser semicircular o triangular; una lámina de oro (transductor plasmónico), con un espesor bien definido y sobre la cual se encuentra inmovilizado el receptor biológico; un sistema de flujo, el cual permite hacer llegar la solución en la que se encuentra el analito hasta la superficie sensora; y un detector, un fotodiodo en el caso de luz monocromática y un espectrómetro en el caso de luz policromática.

Matemáticamente, las condiciones aproximadas de excitación del SPP en la configuración de Kretschmann para el caso  $\lambda = cte$  y para  $\theta = cte$  son, respectivamente.

$$\Rightarrow k_0 \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} + \delta k_{spp} = k_z^{luz}(\lambda, \theta_{spp} + \delta \theta_{spp}) \quad (38-a)$$

$$\Rightarrow k_0 \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} + \delta k_{spp} = k_z^{luz}(\lambda_{spp} + \delta \lambda_{spp}, \theta) \quad (38-b)$$

### 3.3.1. Biosensor SPR-angular

El biosensor SPR-angular emplea una fuente de luz monocromática con polarización TM y un fotodetector o una cámara CCD como mecanismo de detección de la luz. En esta configuración se monitorizan las variaciones del ángulo  $\theta_{spp}$  al que se produce la excitación del SPP; es decir, el ángulo de incidencia al que se obtiene el mínimo de intensidad reflejada (ver Figura 27). En esta configuración existen dos posibilidades. La primera, y más sencilla, es escanear el ángulo de reflexión de un haz de luz colimado. Esta técnica no permite la detección en tiempo real, al tener que determinar la posición del mínimo de reflectancia tras obtener la curva angular  $R_{pp}$ . La segunda opción consiste en incidir con un cono de luz cuyo vértice se encuentre situado en el punto de reflexión. De esta forma se estará incidiendo simultáneamente con varios ángulos de incidencia. Se el cono de luz reflejado se recoge sobre una cámara CCD, será posible monitorizar en tiempo real la posición del mínimo de la resonancia y, por lo tanto, determinar los cambios de índice de refracción.

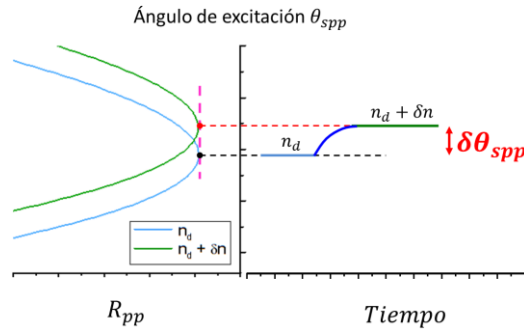


Figura 27 – Biosensor SPR-angular.

### 3.3.2. Biosensor SPR-espectral

El biosensor SPR-espectral emplea una fuente de luz policromática colimada con polarización TM y un espectrómetro como mecanismo de detección de la luz. En esta configuración se monitorizan las variaciones de longitud de onda  $\lambda_{spp}$  a la que se produce la excitación del SPP cuando se incide a un ángulo fijo; es decir, la longitud de onda a la cual la intensidad reflejada es mínima (ver Figura 28).

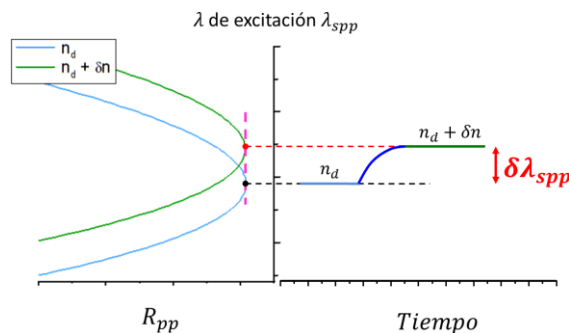


Figura 28 – Biosensor SPR-espectral.

### 3.3.3. Biosensor SPR de intensidad

El biosensor SPR de intensidad puede emplear tanto luz policromática como monocromática, aunque son más habituales los que utilizan luz monocromática. En este último caso, el sistema de detección será un fotodetector estándar. A diferencia de los dos biosensores SPR anteriores, en los SPR de intensidad no se monitoriza el ángulo o la longitud de onda a la que se alcanza la condición de excitación del SPP, sino que lo que se monitoriza es la intensidad de la curva angular de reflectancia en un ángulo concreto, el ángulo en el que la derivada de la curva de  $R_{pp}$  es máxima (ver Figura 29), que será denotado como  $\theta_{spp}$ .

Junto con el biosensor SPR-angular, el biosensor SPR de intensidad (con luz monocromática) es el tipo de biosensor SPR, de los denominados convencionales, más empleado en los dispositivos comerciales debido a su robustez, versatilidad, sencillez y bajo coste; y será el empleado en esta tesis. En el Apéndice C de esta

memoria se puede ver un ejemplo de bioensayo realizado con un biosensor SPR de intensidad con luz monocromática, donde se emplea para la detección de un anticuerpo específico.

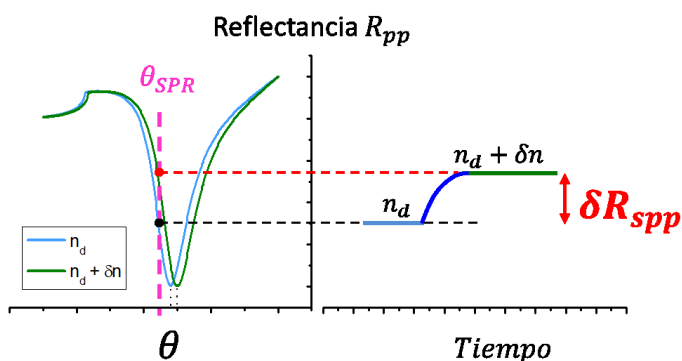


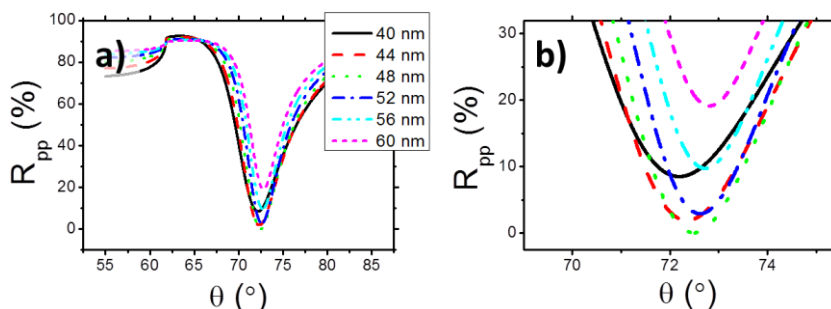
Figura 29 – Biosensor SPR de intensidad.

### 3.4. Reflectancia en configuración de Kretschmann. Espesor óptimo

Del apartado anterior se deduce que el análisis de la reflectancia permite detectar y cuantificar las variaciones de índice de refracción del medio externo. De ahí que sea de suma importancia conocer y comprender en profundidad los parámetros que determinan la magnitud y forma de dicha reflectancia, para así poder optimizar la técnica de detección.

La reflectancia (tanto angular como espectral) experimentada por una lámina metálica en configuración Kretschmann, se puede determinar gracias a la utilización del Método de Matrices de Transferencia (MMT). Este método matemático permite determinar la intensidad de luz reflejada (o transmitida) por un sistema de multicapas de espesor  $d_i$  en función del ángulo y longitud de onda incidentes. Gracias al MMT (ver Apéndice B) la determinación de la reflectancia angular de un sistema de multicapas se reduce a una simple multiplicación de matrices.

Como ya se comentó anteriormente, en esta configuración únicamente se puede excitar el MII, el cual presenta un espesor de corte a partir del cual el modo deja de estar guiado (ver Figura 12). Únicamente cuando el espesor de la lámina metálica sea el de corte se conseguirá una transferencia de energía total y por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada a ese ángulo y para esa longitud de onda será nula ( $R_{pp} = 0$ ). Por esta razón, el espesor de corte se denomina **espesor óptimo** y se denotado como  $d_0$ . La Figura 30 muestra la reflectancia angular calculada en función del espesor de la lámina metálica (en este caso oro) para una longitud de onda incidente de 633 nm. Esta figura muestra cómo, efectivamente,  $R_{pp}$  se anula justo para el espesor de corte indicado en la Figura 12. La Figura 30 también muestra que en efecto, el ángulo al cual se produce la excitación del SPP varía ligeramente con el espesor de la lámina metálica como consecuencia de la contribución del término  $\Delta\beta$ .



**Figura 30 – (a) Reflectancia angular experimentada por una lámina de oro con distintos espesores cuando la longitud incidente es de 633 nm y (b) vista detalle en torno al ángulo de excitación del SPP.**

Una vez demostrada la influencia del espesor de la lámina metálica en la curva de resonancia angular, resultaría muy interesante calcular y analizar cuáles son los espesores que optimizan la resonancia angular y espectral en función de la longitud de onda y el ángulo incidente. En la Figura 31 se muestran los espesores óptimos de una lámina de oro y las curvas angulares y espectros de reflectancia correspondientes a estos espesores. En este cálculo se ha incluido una capa de 2 nm de Ti entre el prisma y la lámina de oro, ya que experimentalmente esta capa será necesaria para mejorar la adhesión entre el prisma (o el sustrato) y la lámina de oro, por lo que se debe tener en cuenta en el análisis teórico. Como constantes dieléctricas del Au, el Ti y el vidrio que compone el prisma se usaron las indicadas en el Apéndice A. En el conjunto de gráficas que forman la Figura 31 se observa que:

- En el caso de luz monocromática (Figura 31-a)), los  $d_0$  para la estructura Agua/Au/2 nm Ti/vidrio se sitúan entre 26 y 52 nanómetros, observándose además un máximo de espesor entorno a una longitud de onda de 700 nanómetros. Por debajo de esta longitud de onda, la dependencia del espesor óptimo con la  $\lambda$  es muy pronunciada.
- Tras ajustar el  $d_0$  (Figura 31-b)), es posible conseguir que la intensidad reflejada  $R_{pp}(\theta_{spp})$  sea prácticamente nula para cualquier longitud de onda del rango visible e infrarrojo cercano. También se aprecia como a mayor longitud de onda incidente, menor será el ángulo al que se produce la excitación del SPP y también será menor la anchura de la curva angular de resonancia.
- En el caso de luz policromática (Figura 31-c) y d), se observa algo muy similar, aunque en este caso referido al ángulo de incidencia. Se observa como el máximo valor de  $d_0$  ( $\sim 52$  nm) es el mismo que el alcanzado en el caso de utilizar luz monocromática y cómo el ángulo de incidencia aumenta al disminuir la longitud de onda de excitación. En este caso, a diferencia del caso monocromático en el que la curva angular de reflectancia se hacía más estrecha al aumentar la longitud de onda incidente, en el caso de luz policromática se alcanza un valor de anchura mínimo en torno a los 700 nm (justo para el ángulo de incidencia en el que el espesor óptimo es máximo y la absorción del oro es mínima).



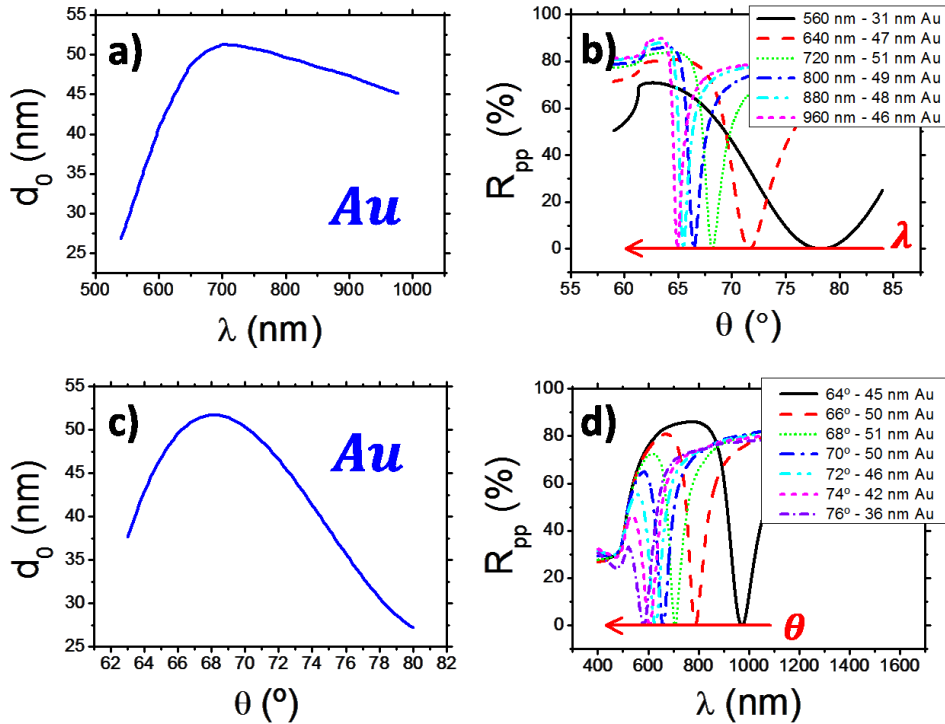


Figura 31 – Espesores óptimos de la capa de oro (a) y (c), y curvas angulares (b) y espectros (d) de reflectancia para algunos de los espesores óptimos calculados.

En definitiva, de la Figura 31 se deduce la importancia que tendrá el espesor de la capa de oro, la longitud de onda incidente o el ángulo de incidencia en el fenómeno de resonancia de plasmón superficial y, por lo tanto, en el comportamiento del sensor SPR. En concreto, se deduce que:

- La optimización de la resonancia; es decir, la obtención de  $R_{pp}(\theta_{spp}) = 0$  o  $R_{pp}(\lambda_{spp}) = 0$ , está relacionada con la absorción total de la capa metálica, la cual está relacionada con el espesor y con la absorción de la capa metálica (la componente imaginaria de la constante dieléctrica). Esto se deduce al observar la dependencia en  $\lambda$  de la parte imaginaria de la constante dieléctrica del Au (ver Apéndice A). Según esta, cuando la parte imaginaria  $\epsilon''_{Au}$  alcanza su valor mínimo o lo que es lo mismo, cuando la absorción óptica es mínima, es cuando el espesor  $d_0$  necesario para optimizar el acoplamiento de energía es máximo.
- A pesar de que la resonancia angular puede ser optimizada para cada longitud de onda incidente (ver Figura 31-b)) o cada ángulo de incidencia (ver Figura 31-c)), la anchura de la resonancia varía en gran medida y se comporta de forma distinta en el caso angular o espectral. De ahí que sea necesario analizar la influencia de  $\lambda$  y  $\theta$  en la respuesta del sensor SPR estando el espesor del transductor optimizado para esas condiciones.

### 3.5. Sensibilidad del biosensor SPR

Sea cual sea la configuración empleada, la sensibilidad de un biosensor SPR dependerá drásticamente de:

- La dependencia del vector de ondas del SPP con las variaciones producidas en el medio externo ( $\delta k_{spp}$ ).
- La distancia de penetración del campo electromagnético en el dieléctrico ( $\delta_d$ ) y la distancia de propagación del SPP ( $L_{spp}$ ).

Todos estos parámetros dependen de las constantes dieléctricas de los distintos medios, que a su vez dependerán de la longitud de onda. Por lo tanto, se define un parámetro denominado Sensibilidad del biosensor SPR en configuración  $i$  ( $\eta_{SPR}^i$ ) como:

$$\eta_{SPR}^i(\lambda) = \frac{\delta S(\lambda)}{\delta n} \quad (39)$$

siendo  $\delta S$  la *variación de señal* registrada a cada  $\lambda$  para cada tipo de sensor ( $\delta\theta_{spp}$  para SPR-angular,  $\delta\lambda_{spp}$  para SPR-espectral y  $\delta R_{spp}$  para SPR de intensidad),  $\delta n$  es el cambio de índice de refracción experimentado por el medio externo, mientras que  $i$  es un superíndice que permite diferenciar entre las tres configuraciones de SPR descritas anteriormente. Por simplicidad el análisis desarrollado en este apartado se realizó únicamente para el biosensor SPR de intensidad, ya que es el empleado durante esta tesis doctoral. Una de las grandes ventajas de este tipo de sensor SPR respecto al SPR-angular o espectral es el hecho de que en el sensor SPR de intensidad no se necesita desarrollar un algoritmo que identifique constantemente la posición (el ángulo o la longitud de onda) del mínimo de la curva de reflectancia. En el caso del SPR de intensidad bastará con obtener al inicio de la medida el ángulo de máxima pendiente  $\theta_{SPR}$  y monitorizar el valor de reflectancia a ese ángulo (ver Figura 29).

Para determinar de forma teórica la *variación de señal*  $\delta S$  experimentada en el sensor SPR, se recurre al MMT (ver Apéndice B). Realizando este cálculo numérico (por medio de los programas de cálculo desarrollados durante esta tesis) para dos índices de refracción del medio externo ( $n_1$  y  $n_2 = n_1 + \delta n$ ), resultará sencillo determinar la *variación de señal* producida por  $\delta n$  y por lo tanto, la *Sensibilidad* experimentada por cada tipo de biosensor SPR. Como sistema de multicapas empleamos el indicado en la Figura 32, donde se vuelve a incluir la capa de 2 nm de Ti en los cálculos teóricos, ya que esta es necesaria experimentalmente para conferir mayor estabilidad al transductor plasmónico. También por razones prácticas, como índice de refracción del medio externo se usó el del agua desionizada a 25°C  $n_d = 1,3323 RIU$ , mientras que la variación de señal  $\delta S$  se calculó para un  $\delta n = 5 \cdot 10^{-4} RIU$ . En cada caso, el espesor de la lámina de oro era aquel que optimizada la resonancia, determinados en la Figura 31.

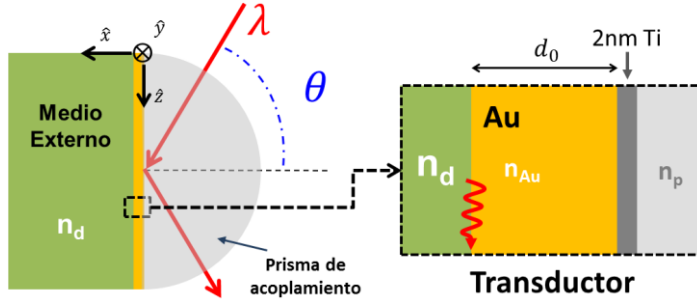


Figura 32 – Geometría y notación empleada en el análisis teórico de sensibilidad del biosensor SPR.

En el caso del sensor SPR de intensidad, la variación de señal vendrá dada por la variación de intensidad de luz  $p$ -polarizada reflejada  $\delta R_{spp}$  en el ángulo de máxima pendiente de la curva de resonancia angular o espectral, de tal forma que:

$$\eta_{SPR}^R(\lambda) = \frac{\delta R_{pp}(\lambda)}{\delta n} \quad (40)$$

Analizando la Figura 29 se aprecia que en esta configuración, la sensibilidad no sólo dependerá de la variación  $\delta k_{spp}$ , si no que en este caso el valor de máxima pendiente alcanzado por la curva de resonancia  $R_{pp}$  será determinante a la hora de maximizar  $\delta R_{pp}$ . La Figura 33-a) muestra la dependencia de  $\eta_{SPR}^R$  con la longitud de onda incidente, mientras que la Figura 33-b) muestra el valor de  $\eta_{SPR}^R$  normalizado respecto a su valor máximo, permitiendo cuantificar de forma más sencilla la variación de sensibilidad experimentado por  $\eta_{SPR}^R$ .

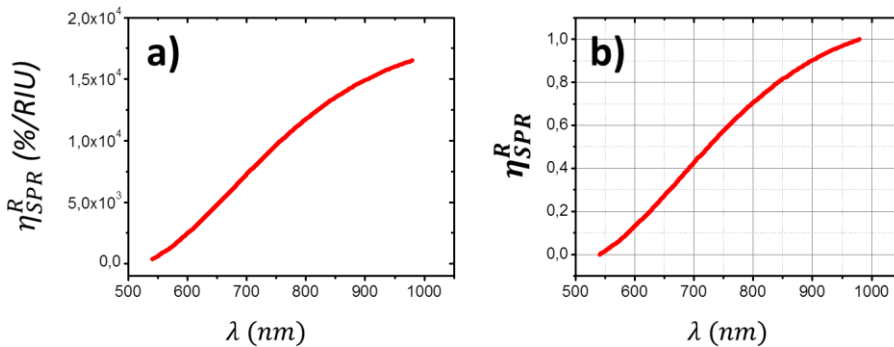


Figura 33 – Sensibilidad en función de la longitud de onda incidente para el biosensor SPR de intensidad: (a) en porcentaje de reflectancia/RIU y (b) normalizado entre [0,1].

Esta figura muestra que, a diferencia de lo que cabría esperar por la dependencia en  $\lambda$  de  $\delta k_{spp}$  (ver Figura 23), la sensibilidad del biosensor SPR de intensidad incrementa al aumentar el valor de la longitud de onda incidente. De esto se deduce que:

- El biosensor SPR de intensidad es más sensible a longitudes de onda próximas al infrarrojo.
- El incremento de la pendiente angular de  $R_{pp}(\theta_{spp})$  (ver Figura 31-b)) es mayor que la disminución de  $\delta k_{spp}$  (y por lo tanto, del desplazamiento angular de la curva) experimentada como consecuencia del aumento de la longitud de onda incidente.

Si se realiza un análisis similar para el sensor SPR-angular y SPR-espectral, se llega a las mismas conclusiones. La diferencia principal con el caso del sensor SPR de intensidad es que, en el angular y el espectral, ha de tenerse en cuenta la diferente anchura de las curvas de resonancia (vista en la Figura 31) a la hora de analizar el parámetro  $\eta_{SPR}^i(\lambda)$ . Esto se debe a que ambos tipos de sensores están basados en la determinación de la posición angular y espectral de la resonancia y por lo tanto, la precisión en la determinación de esta posición y de su variación dependerá de la anchura de las curvas.

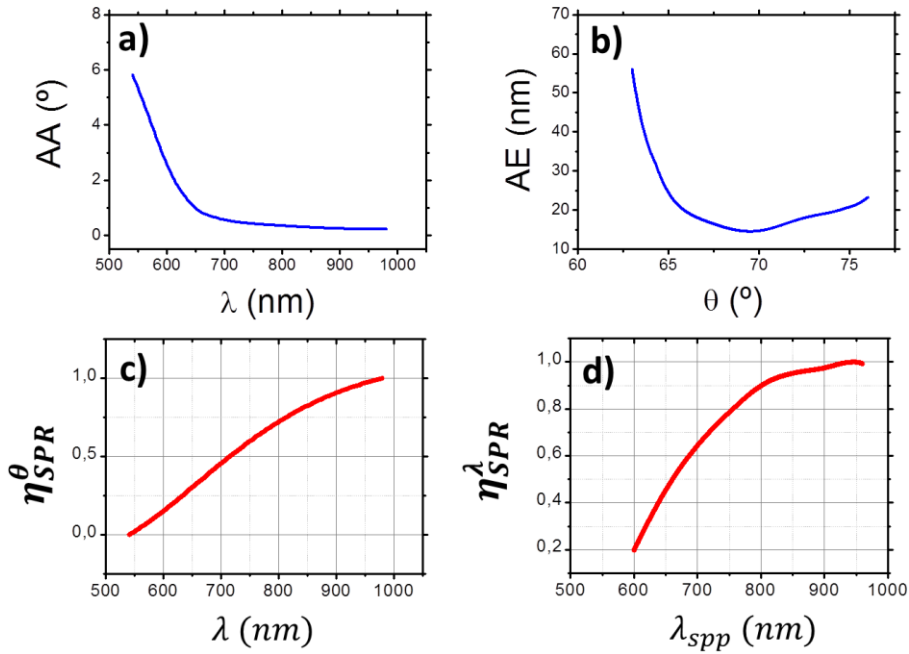


Figura 34 – (a) Anchura angular y (b) espectral de la curva de resonancia en función de la longitud de onda y del ángulo incidente evaluada en  $R_{pp} = 5\%$ . Sensibilidad normalizada para el (c) sensor SPR-angular y (d) sensor SPR-espectral en función de la longitud de onda incidente.

De esta forma, tras dividir  $\eta_{SPR}^i$  y  $\eta_{SPR}^i$  por los valores de la anchura de la curva angular (AA) y espectral (AE) mostrados en la Figura 34-a) y b), la sensibilidad normalizada de ambos dispositivos muestra la misma dependencia con la longitud de onda (ver Figura 34-c) y d)) que la obtenida para el SPR de intensidad. En el caso del SPR-espectral, donde la fuente de luz empleada es policromática, lo que se muestra es la dependencia de la sensibilidad normalizada respecto a la longitud de onda de

excitación de la resonancia, estando  $\lambda_{spr}$  relacionada con el ángulo de incidencia mediante la relación indicada en la Figura 20. De este análisis se deduce que la sensibilidad del biosensor SPR en configuración de Kretschmann (para cualquiera de sus configuraciones), se maximiza a altas longitudes de onda en el caso de luz incidente monocromática y a bajos ángulos de incidencia en el caso de luz incidente policromática. Es importante tener presente que, la sensibilidad  $\eta_{SPR}^i$  permite determinar la sensibilidad de la técnica o método de detección empleado en los diferentes sensores SPR, pero no permite compararlos entre sí. Para caracterizar un dispositivo sensor debemos analizar su respuesta sensora.

### 3.6. Respuesta sensora

Para poder comparar entre sí los diferentes tipos de sensores SPR e incluso, para poder comparar estos con otro tipo de sensor, resulta necesario determinar la respuesta sensora de cada uno de ellos; es decir, la relación entre la sensibilidad y el ruido del sistema. En el caso del sensor SPR, este parámetro (denotado como  $\mathcal{S}_{SPR}^i$ ) se define como:

$$\mathcal{S}_{SPR}^i(\lambda) = \frac{\eta_{SPR}^i(\lambda)}{\sigma_i} \quad (41)$$

donde  $\sigma_i$  representa el ruido del sistema (el nivel de incertidumbre en la medida) e  $i$  es un superíndice que permite diferenciar entre las diferentes configuraciones de SPR. El parámetro  $\sigma_i$  depende de diversos factores como: la fuente de luz, el detector, la estabilidad mecánica y térmica, el tipo y herramientas de procesamiento de señal, el sistema de flujo utilizado, etc. Si todos estos parámetros no son iguales o no son tenidos en cuenta a la hora de realizar una comparación, esta no será equilibrada y perderá toda validez.

Para poder determinar cuál de las tres configuraciones de sensor SPR era más sensible, Pilarik y Homola [107] desarrollaron un análisis teórico de la respuesta sensora de cada uno de los sensores, demostrando de forma analítica que la respuesta sensora de un biosensor SPR es independiente del método de excitación empleado (acoplamiento por prisma o red de difracción) o de la variable analizada (intensidad reflejada, ángulo o longitud de onda de excitación) y que dependía principalmente del ruido del sistema. Según esto, teóricamente es posible alcanzar el mismo LOD en cualquiera de las configuraciones si se emplea la misma longitud de onda. Sin embargo, el LOD experimental dependerá drásticamente del ruido experimental del sistema desarrollado. De ahí, que dos sensores SPR basados en la misma técnica de medición y trabajando a la misma longitud de onda, pero con componentes ópticos u electrónicos distintos, no posean la misma respuesta sensora experimental, a pesar de su idéntica sensibilidad. Por esta razón, la respuesta sensora es el parámetro más importante de un sensor, ya que no sólo determina su LOD experimental, si no que permite comparar su respuesta con la de otro tipo de sensores.

### 3.7. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se han alcanzado conclusiones muy útiles para el desarrollo y optimización de biosensores plasmónicos:

- Se ha obtenido la variación del vector de ondas del plasmón superficial excitado en configuración Kretschmann (modo MII) debido a los cambios de índice de refracción del medio externo; demostrándose que, a pesar de que esta variación depende del espesor de la lámina metálica, su valor puede ser aproximado por el de la variación que experimenta un SPP que se propaga por una única interfase metal/dieléctrico. Esto nos ha permitido obtener una expresión analítica para la variación  $\delta k_{spp}$ , la cual ha posibilitado la determinación de la dependencia de este parámetro con la longitud de onda incidente. Así se ha podido demostrar que, en el rango de longitudes de onda evaluadas, el parámetro  $\delta k_{spp}$  disminuye a medida que se aumenta la longitud de onda, lo cual implica que los cambios en la condición de excitación del SPP ( $\delta\theta_{spp}$  y  $\delta\lambda_{spp}$ ) como consecuencia de la variación del índice de refracción del medio externo serán menores a medida que se aumenta la longitud de onda incidente.
- Se ha determinado que  $\delta k_{spp}$  no es el único parámetro que define la sensibilidad de un biosensor SPR. Existirá un compromiso entre dicha dependencia y la anchura e intensidad de la resonancia de plasmón superficial. Tanto es así que, a diferencia de lo que cabría esperar, la sensibilidad del sensor SPR se hace mayor a medida que aumenta la longitud de onda incidente. Lo que implica que, en un dispositivo sensor SPR, sea mejor emplear una longitud de onda próxima al infrarrojo.
- Un requerimiento común en todos los tipos de biosensores SPR es la necesidad de optimizar el espesor de la capa metálica que forma el transductor, de tal forma que la intensidad de la luz reflejada en el ángulo o la longitud de onda de excitación del SPP sea mínima. En esta situación, se maximiza la pendiente y se minimiza la anchura de la curva angular y espectral de resonancia, de tal forma que se aumenta la sensibilidad del sensor SPR.
- Finalmente, se ha hecho especial hincapié en resaltar la especial relevancia que posee el ruido del sistema a la hora de establecer la respuesta sensora de todo sensor, así como la importancia de este a la hora de realizar una comparativa sensora entre diferentes dispositivos.

# Capítulo 4

## MODULACIÓN PLASMÓNICA

*"Los que aseguran que es imposible no deberían  
interrumpir a los que estamos intentándolo."*

THOMAS ALVA EDISON

---

Para extraer el verdadero potencial asociado a los SPP sería necesario poder controlarlos de una forma dinámica; es decir, poder manipular o alterar esas ondas superficiales (su intensidad y fase) creando así dispositivos activos. La dependencia del  $k_{spp}$  con las constantes dieléctricas de los medios que conforman la interfase por la que se propaga el SPP, la misma dependencia que permite el desarrollo del sensor SPR, también puede ser empleada para alterar de una forma controlada el SPP. Cualquier modificación controlada de las constantes dieléctricas de los medios por los que se propaga el SPP alteraría el  $k_{spp}$  y, por lo tanto, modificaría sus propiedades.

La idea básica de los dispositivos plasmónicos activos es la de inducir un **cambio reversible** en las propiedades ópticas de los materiales que forman la interfase metal/dieléctrico. El término *active plasmonics* fue introducido en 2004 por Krasavin y Zheludev [108], en un artículo en el que describen una técnica para desarrollar interruptores de plasmones superficiales a frecuencias ópticas. Para ello, Krasavin y Zheludev depositaron sobre la capa metálica una capa delgada de un dieléctrico activo (un dieléctrico cuyas propiedades dependan de alguna variable externa como la corriente, la luz, el campo magnético, la temperatura...), lo que permite modificar la constante dieléctrica del medio dieléctrico. En concreto, usaron la capacidad del galio para transitar entre dos estados (sólido-líquido) cuando es iluminado con un intenso haz de luz. Desde entonces, los científicos han explorado diferentes sistemas de materiales activos basados en materiales termo [109] y

electro-ópticos [110], *puntos cuánticos* [111], moléculas fotocromáticas [112], etc., para así conseguir modular el SPP. De igual forma, la posibilidad de modificar las propiedades ópticas de ciertos metales también ha sido investigada. En este caso surgen dos posibilidades: utilizar un metal cuyas propiedades puedan ser modificadas directamente [113] o introducir en el metal (en las proximidades de la interfase) una capa delgada de algún medio activo [114], que puede ser además plasmónico o no.

A pesar de que los dispositivos plasmónicos activos han sido mayoritariamente enfocados al desarrollo de circuitos ópticos integrados o dispositivos fotónicos [115–119], debido fundamentalmente a la capacidad del SPP de guiar y confinar la luz en regiones inferiores a la longitud de onda de la luz, esta no es la única aplicación importante de este fenómeno. El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis fue el primero en desarrollar y patentar [120] un biosensor plasmónico activo, demostrando que gracias a la modulación plasmónica es posible aumentar la sensibilidad de los sensores SPR convencionales.

#### 4.1. Técnicas de aumento de sensibilidad

La sensibilidad de los sensores de SPR y sus LOD han sido ampliamente estudiados, tanto teóricamente como experimentalmente. El LOD experimental (en cambios de índice de refracción) establecido para el sensor SPR varía, dentro de un rango comprendido entre  $10^{-5}$  y  $10^{-8}$  RIU, dependiendo de la configuración y elementos empleados en el dispositivo, mientras que su límite de detección como biosensor se encuentra entre 1 y 5  $pg \cdot mm^{-2}$  de biomaterial analizado (ver Tabla 3). Este límite de detección resulta insuficiente para la detección directa de bajas concentraciones de moléculas con bajo peso molecular (<5 kDa). Con un biosensor SPR convencional, la detección de determinados agentes infecciosos, mutaciones puntuales en cadenas de ADN (SPNs), contaminantes medioambientales, o interacciones proteína-proteína en el rango femtomolar necesarios para la detección de los primeros estadios de algunas enfermedades, como el cáncer, es compleja y no se pueda realizar de forma directa. De ahí que sea necesario el desarrollo de sensores plasmónicos con una mayor sensibilidad. Y es que a pesar de que se han desarrollado técnicas indirectas (como formatos de ensayo competitivo o de inhibición [50]) que posibilitan la detección de analitos de bajo peso molecular con un biosensor SPR, para ciertas aplicaciones este tipo de formatos no pueden ser empleados o resulta más útil emplear un formato de detección directa.

A la hora de tratar de aumentar la sensibilidad de los biosensores SPR convencionales se han empleado fundamentalmente dos estrategias: la modificación de las propiedades físicas del plasmón superficial (intensidad del campo electromagnético, distancia de propagación y distancia de penetración) y el desarrollo de nuevas técnicas sensoras basadas en plasmones superficiales. El objetivo de ambas técnicas es incrementar la sensibilidad (en al menos un orden de magnitud), manteniendo a la vez las ventajas inherentes del biosensor SPR convencional basado en configuración de Kretschmann.



#### **4.1.1. Modificación de las propiedades físicas del plasmón superficial**

Para tratar de aumentar la *intensidad del campo electromagnético, la distancia de penetración o de propagación del SPP*, se han empleado básicamente dos métodos:

- El empleo de técnicas de excitación distintas de la configuración de Kretschmann.
- La utilización de estructuras o materiales diferentes a la lámina de oro como transductor plasmónico.

En el primer método, la utilización de guías de ondas como técnica de excitación del SPP (ver Figura 17) ha permitido aumentar hasta en un 50% la intensidad del campo electromagnético en la interfase [121] o incrementar en gran medida la distancia de propagación [122], consiguiendo así aumentar la sensibilidad de los biosensores SPR respecto a los convencionales. Además, el uso de guías de onda aumenta la capacidad de integración de los dispositivos, pero todo ello a cambio de perder gran parte de la simplicidad y bajo coste que ofrecen los basados en la configuración de Kretschmann. En el segundo método, el estudio de nuevos materiales ha permitido el aumento de sensibilidad gracias a la utilización de prismas con un mayor índice de refracción [123]; el empleo de materiales de adhesión menos absorbentes, como óxidos de metales [124,125] o capas orgánicas [126]; o la sustitución de la lámina de Au por una estructura o material con mejores propiedades plasmónicas, como metamateriales [127] o semiconductores dopados [128], etc. A pesar de que con el segundo método también se ha demostrado, experimental y/o teóricamente, que es posible aumentar la sensibilidad del biosensor SPR, las estructuras o materiales empleados carecen de la estabilidad, facilidad de fabricación y bajo coste de los transductores y los sustratos convencionales. Conviene recordar que el material plasmónico empleado para evaluaciones biosensoras ha de ser funcionalizable, y que el Au es sencillo de depositar y funcionalizar. Por todo esto, la dificultad de convertir estos prototipos de laboratorio en sistemas comerciales sugiera que estos no desbancarán al biosensor SPR convencional como primera opción tecnológica, al menos en un futuro cercano.

#### **4.1.2. Desarrollo de nuevas técnicas sensoras basadas en plasmones superficiales**

El desarrollo de métodos de detección capaces de medir con un mayor grado de sensibilidad las variaciones de índice de refracción experimentadas por el medio externo es otra de las opciones más analizadas. Dentro de las técnicas desarrolladas hasta el momento, sobresalen particularmente dos: los dispositivos SPR-interferométricos y los denominados SPR-modulados.

##### **4.1.2.1. SPR-interferométricos**

Las técnicas interferométricas han demostrado ser extremadamente sensibles en campos tan dispares como la astronomía y la metrología, debido al uso de una señal de referencia que proporciona estabilidad y minimiza las variaciones de señal debidas

a variables ajenas a la de interés. Este tipo de técnicas se caracterizan por combinar dos o más ondas (o señales) sometidas a diferentes perturbaciones, creándose así una onda (o señal) resultante, de cuyos parámetros característicos (intensidad, fase, polarización, etc.) es posible extraer la información deseada. Este concepto, que ha permitido la creación de dispositivos ópticos interferométricos de alta sensibilidad, también ha sido aplicado a los biosensores plasmónicos. Se han creado dispositivos interferométricos de SPR de tipo intrínseco y extrínseco; es decir, basados en la interferencia directa de dos plasmones superficiales [129–131] o en la interferencia de una señal SPR con alguna señal de referencia [132–134]. En el caso intrínseco, estos dispositivos han de ser fabricados con costosas y relativamente complejas técnicas de micro y nanofabricación. El acoplamiento de luz se realiza mediante guías de onda y por lo tanto, se pierde la sencillez, versatilidad y bajo coste de los biosensores SPR convencionales. Sin embargo, este tipo de dispositivos son una clara alternativa cuando se habla de futuribles biosensores ópticos integrados. En el caso extrínseco, los dispositivos desarrollados se asemejan más a los SPR convencionales. En estos, a pesar de que se continúa empleando el acoplamiento mediante prisma, el esquema de los dispositivos se vuelve muy costoso y complejo. Además, en muchos casos, el tratamiento y procesado de la señal puede ser lento y difícil de interpretar. Por lo tanto, la utilidad de este tipo de dispositivos se encuentra un poco en entredicho. Además de estos inconvenientes, ambos tipos de SPR-interferométricos, requieren de una alta estabilización mecánica que complica enormemente la posibilidad de desarrollar dispositivos portátiles que pueden trabajar fuera de la estabilidad y control proporcionados por un laboratorio.

#### 4.1.2.2. SPR-modulados

Como es conocido, las técnicas de modulación pueden incrementar la relación señal-a-ruido (SNR, del inglés *signal-to-noise*) de señales muy débiles y, por lo tanto, mejorar el LOD de un sensor. Básicamente, la modulación consiste en hacer que un parámetro (amplitud, fase, polarización, etc) de la onda o señal de interés cambie de valor de acuerdo con las variaciones de la señal moduladora. Aplicado a los biosensores SPR, esto supone variar la señal de respuesta del SPR de acuerdo a una señal de excitación (o moduladora) controlada. En el caso de los sensores plasmónicos, hasta ahora se han desarrollado principalmente dispositivos SPR-modulados de forma mecánica [135–137] y modulados en fase [138,139]. Los primeros generan la modulación del SPP mediante la variación mecánica del ángulo de incidencia, mientras que en los segundos se modula la fase de la señal de respuesta del sensor. La señal modulada, al igual que la señal de respuesta del SPR, depende del índice de refracción del medio externo y por lo tanto, puede ser empleada para cuantificar las variaciones del medio externo. Ambas técnicas de modulación (consideradas como extrínsecas por no alterar físicamente el SPP) aseguran ser capaces de incrementar la sensibilidad del biosensor SPR convencional. Sin embargo, en ninguno de esos biosensores se realiza una comparativa rigurosa (bajo las mismas condiciones) con un biosensor SPR convencional. Además, el mayor inconveniente de estos dispositivos vuelve a ser la complejidad y alto coste del dispositivo final. Como alternativa, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis, presentó en 2006 un prototipo de biosensor modulado magneto-ópticamente [140], basado en la modulación intrínseca (es decir, de forma directa) del SPP. Los resultados preliminares demostraron que esta técnica es capaz de aumentar en un factor 3 la

sensibilidad del biosensor SPR convencional y que por lo tanto, se estaba ante una muy prometedora técnica de modulación plasmónica. Por esta razón, uno de los objetivos principales de esta tesis es el estudio y optimización de este tipo de sensor.

## 4.2. La modulación plasmónica como técnica sensora

### 4.2.1. Principio de funcionamiento

Es obvio que a la hora de diseñar un biosensor plasmónico activo resulta conveniente no alterar el medio dieléctrico (el medio externo), ya que son las variaciones de este medio las que nos permitirán calcular la concentración de analito detectada por el elemento de reconocimiento biológico. De ahí que la mejor opción para modificar el vector de ondas del SPP sea hacerlo a través de la alteración de las propiedades ópticas del metal. Dependiendo del tipo de material, sus propiedades ópticas pueden depender de una gran cantidad de variables externas; como por ejemplo, temperatura, presión, corriente eléctrica, voltaje, campo magnético, etc. De esta forma, son muchas las opciones de las que se dispone para alterar las propiedades ópticas del metal, y con ello el vector de ondas del SPP.

A lo largo de esta memoria se ha demostrado que el  $k_{spp}$  posee una importante dependencia con las constantes dieléctricas de los medios por los que se propaga el SPP, el medio dieléctrico ( $\epsilon_d$ ) y el metal ( $\epsilon_m$ ). Esto implica que cualquier alteración en la constante dieléctrica del metal  $\Delta\epsilon_m$  generará, a su vez, una alteración del vector de ondas del SPP. De esta forma, el vector de ondas del SPP pasaría a ser:

$$\hat{k}_{spp}(\epsilon_m + \Delta\epsilon_m, \epsilon_d) = k_{spp}(\epsilon_m, \epsilon_d) + \Delta k_{spp}(\Delta\epsilon_m, \epsilon_d) \quad (42)$$

donde en este caso,  $\hat{k}_{spp}$  resulta ser la suma de dos términos: uno función de las constantes dieléctricas del metal y el dieléctrico (denotada como  $k_{spp}$ ) y el otro, consecuencia de la alteración de la constante dieléctrica del metal y denotada como  $\Delta k_{spp}$ .

Conviene resaltar la diferencia existente entre la modificación del vector de ondas del SPP fruto de la variación del medio externo  $\delta k_{spp}(\epsilon_m, \delta\epsilon_d)$  analizada en el Capítulo 3 (ver Figura 35-a)), y la debida a la alteración de ese mismo vector de ondas como consecuencia de la modificación de la constante dieléctrica del metal  $\Delta k_{spp}(\Delta\epsilon_m, \epsilon_d)$  (ver Figura 35-b)). Dependiendo de la técnica empleada para alterar el valor de  $\epsilon_m$ , dicha variación podrá realizarse de forma periódica, generándose así una **modulación** del  $k_{spp}$ . La frecuencia de modulación también dependerá del tipo de material o de la técnica de modulación empleada (termo-óptico, electro-óptico, magneto-óptico, etc.). A lo largo de esta memoria, los parámetros  $\delta k$  se referirán a cambios debidos a la variación del índice de refracción del medio externo, mientras que los parámetros  $\Delta k$  harán referencia a cambios debidos a la alteración del índice de refracción del metal.

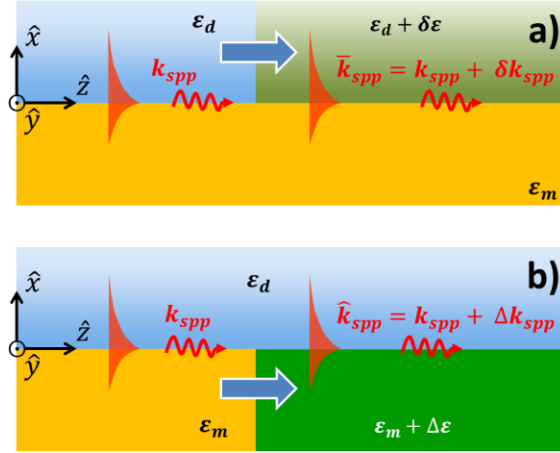


Figura 35 –Esquema y notación empleada para referirse a la variación del vector de ondas del SPP  $\delta k_{spp}$  como consecuencia de: (a) la variación del índice de refracción del medio externo  $\delta n$  y (b) como consecuencia de la alteración del vector de ondas del SPP  $\Delta k_{spp}$  debida a la alteración  $\Delta n$  de la constante dieléctrica del metal.

Como se puede apreciar en la ecuación (42), el término  $\Delta k_{spp}$  generado por la alteración  $\Delta \epsilon_m$  depende de la constante dieléctrica del medio externo  $\epsilon_d$ . Así, de forma similar a como se utiliza  $k_{spp}$  en el biosensor SPR,  $\Delta k_{spp}$  podría ser usado como variable sensora. En el apartado 3.1.2 se obtuvo la dependencia de  $\delta k_{spp}$  ante un pequeño cambio de índice de refracción  $\delta \epsilon$  volumétrico. Debido a la simetría que presenta la ecuación del vector de ondas del SPP respecto a las constantes dieléctricas de los medios ( $k_{spp}$  no varía al sustituir  $\epsilon_d \rightarrow \epsilon_m$  y  $\epsilon_m \rightarrow \epsilon_d$ ), el análisis realizado en ese apartado y, por tanto, la expresión analítica deducida puede ser empleada también en el caso de una pequeña alteración  $\Delta \epsilon_m$  de la constante dieléctrica del metal generada por la variable externa. De esta forma se tiene que, en el caso de que  $\Delta \epsilon_m \ll \epsilon_m$ , el término  $\Delta k_{spp}$  vendrá dado por:

$$\Delta k_{spp} = \frac{(k_{spp})^3}{2 \cdot k_0^2 \cdot \epsilon_m^2} \cdot \Delta \epsilon_m \quad (43)$$

donde por simplicidad se ha supuesto que la alteración  $\Delta \epsilon_m$  se produce en toda la capa metálica. La situación sería muy similar en el caso de que solamente una parte de la capa metálica modificara su constante dieléctrica. En este caso existiría una dependencia con el espesor de la capa metálica activa [114], de igual forma que la  $\delta k_{spp}|_{superficial}$  depende del espesor  $d$  de la capa dieléctrica que modifica el índice de refracción del medio externo.

#### 4.2.2. Modulación de la reflectancia en configuración Kretschmann

En el caso de la excitación del SPP mediante la configuración de Kretschmann, cuando se altera el valor del vector de ondas del SPP se están modificando las condiciones para las cuales se cumple la condición de excitación del SPP. Según esto, cualquier alteración en el vector de ondas del plasmón superficial ( $\Delta k_{spp}$ ) como consecuencia de la variación de la constante dieléctrica del metal ( $\epsilon_m + \Delta \epsilon_m$ ),

provocará un cambio en el ángulo de incidencia y/o la longitud de onda a la que se cumple la condición de excitación. Matemáticamente, en el caso de emplear una fuente de luz monocromática o policromática, esta alteración puede ser expresada como:

$$\Rightarrow k_0 \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} + \Delta k_{spp} = k_z^{luz}(\lambda, \theta_{spp} + \Delta\theta_{spp}) \quad (44-a)$$

$$\Rightarrow k_0 \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} + \Delta k_{spp} = k_z^{luz}(\lambda_{spp} + \Delta\lambda_{spp}, \theta) \quad (44-b)$$

Por lo tanto, cuando se incide con un haz monocromático ( $\lambda = cte$ ) se observará un desplazamiento ( $\Delta\theta_{spp}$ ) del ángulo al que se alcanza la condición de excitación del SPP (ver ecuación (44-a)), mientras que en el caso de fijar el ángulo de incidencia y utilizar luz policromática, lo que variará será la longitud de onda a la que se cumple la condición de excitación ( $\Delta\lambda_{spp}$ ). De esta forma, se puede afirmar que un cambio  $\Delta\varepsilon_m$  en las constantes ópticas del metal generará una alteración en la condición de excitación del SPP ( $\theta_{spp}, \lambda_{spp}$ )  $\rightarrow$  ( $\hat{\theta}_{spp}, \hat{\lambda}_{spp}$ ). La Figura 36-a) muestra de forma gráfica, para  $\lambda = cte$ , el desplazamiento angular  $\Delta\theta_{spp}$  generado en la curva de resonancia angular  $R_{pp}$  como consecuencia de la alteración de la constante dieléctrica del metal<sup>10</sup>.

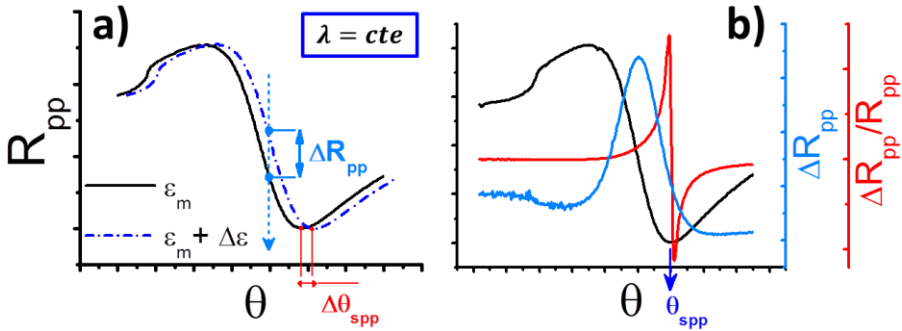


Figura 36 – Modulación plasmónica: (b) variación angular producida en la curva angular de resonancia como consecuencia de la alteración de la constante dieléctrica del metal  $\Delta\varepsilon$  y (c) curvas angulares de variación y de variación relativa de reflectancia.

De esta figura se deduce que, si la alteración  $\Delta\varepsilon$  se produce de forma periódica, entonces será posible modular el SPP y generar una señal alterna de variación de reflectancia  $\Delta R_{pp}$ . Esta señal alcanza su máximo valor en el ángulo de máxima pendiente de  $R_{pp}$  (el ángulo de medida del SPR convencional y denotado como  $\theta_{SPR}$ ) y será cero en las proximidades del máximo y el mínimo de la curva angular  $R_{pp}$ . Por lo tanto, la alteración de la reflectancia  $\Delta R_{pp}$  proporcionará acceso a la derivada angular de la curva de reflectancia  $R_{pp}$ :

<sup>10</sup> La situación será similar en el caso de la curva espectral de resonancia.

$$\Delta R_{pp} = \frac{\partial R_{pp}}{\partial \theta} \cdot \Delta \theta_{spp} \quad (45)$$

Como se puede observar en la Figura 36-b), la variación relativa de reflectancia<sup>11</sup> ( $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ ) se maximiza en las proximidades del ángulo de excitación del SPP. Esto se debe a la disminución de la intensidad de luz reflejada que se produce en  $\theta_{spp}$  como consecuencia de la transferencia de energía producida al excitarse el SPP. Matemáticamente, el denominador disminuye de valor y por lo tanto, el cociente  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  aumenta notablemente. Cuanto mayor sea el parámetro  $\Delta R_{pp}$  en las proximidades de  $\theta_{spp}$  y menor el valor alcanzado en  $R_{pp}(\theta_{spp})$ , mayor será este cociente.

#### 4.2.3. Técnica de medición

A diferencia del sensor SPR convencional, en un sensor SPR-modulado los cambios de índice de refracción del medio externo ( $\delta n$ ) son detectados a través de las variaciones del parámetro  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , mientras que en el sensor SPR se emplea la variación de la reflectancia  $R_{pp}$  como parámetro con el que cuantificar los cambios de índice de refracción sufridos por el medio externo. Como muestra la Figura 37, si se optimiza la variación relativa de reflectancia, las variaciones producidas como consecuencia de un cambio de índice de refracción del medio externo pueden ser mayores en  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  que las producidas en  $R_{pp}$ .

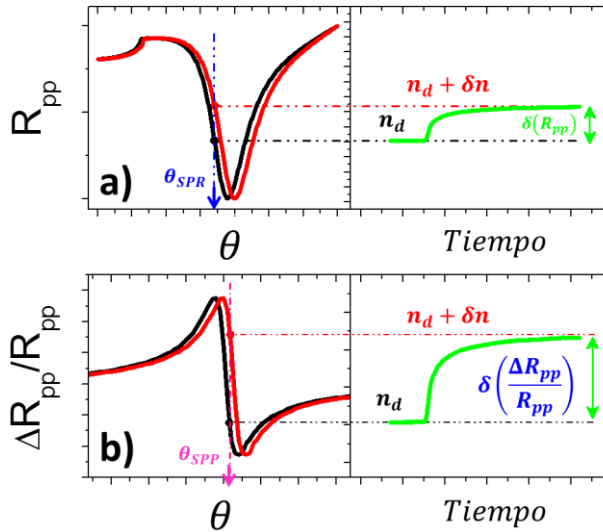


Figura 37 – Esquema comparativo de la respuesta sensora de (a) un biosensor SPR convencional y (b) un biosensor SPR-modulado ante un mismo cambio de índice de refracción del medio externo  $\delta n$ .

<sup>11</sup> El cociente entre la alteración y el valor de la reflectancia para cada ángulo.

En el caso de que el desplazamiento angular sufrido por ambas curvas sea el mismo, si el máximo de la derivada angular de la curva  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  es mayor que el de la curva angular  $R_{pp}$ , entonces la variación de señal generada por un cambio de índice de refracción del medio externo  $\delta n$  será mayor en el caso modulado que en el convencional<sup>12</sup>. Ya que el valor de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  depende drásticamente del valor de  $R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP ( $\theta_{spp}$ ), y este último depende del espesor de la capa metálica (ver apartado 3.4), la optimización de la transferencia de energía entre la luz incidente y el SPP será fundamental en la respuesta del SPR-modulado.

Finalmente, recordar que la respuesta sensora de un dispositivo depende de la sensibilidad y del ruido del sistema. Por lo tanto, para incrementar la respuesta sensora del biosensor SPR convencional, lo que en realidad se debe maximizar es la relación señal a ruido del biosensor SPR-modulado; es decir, el cociente entre la variación de señal producida en el parámetro  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  ante los cambios de índice de refracción del medio externo y el nivel de incertidumbre de esa variación de señal (el ruido del sistema).

---

<sup>12</sup> Notar que, en el caso del SPR-modulado, el ángulo al que se produce la máxima derivada angular de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  no es  $\theta_{SPR}$  (el ángulo al cual la derivada angular de  $R_{pp}$  es máxima), si no el ángulo en el que se cumple la condición de excitación del SPP ( $\theta_{spp}$ ).





# Capítulo 5

## BIOSENSOR MOSPR

*“Si el plan A falla, recuerda que tienes otras 26 letras”*

*VISTO EN INTERNET*

---

Los denominados *efectos magneto-plasmónicos* surgen de la excitación simultánea de efectos magneto-ópticos y ondas de plasmón superficial en estructuras que poseen actividad magneto-óptica y plasmónica. Dicha interacción puede generar interesantes efectos, diferentes según sea la relación entre la dirección de la imanación y la polarización de la luz incidente. En el año 2006 se demostró [140] que, gracias a la combinación del efecto Kerr transversal magneto-óptico (TMOKE) y de la resonancia de plasmón superficial, es posible desarrollar un nuevo tipo de sensor SPR-modulado, denominado biosensor *magneto-óptico de resonancia de plasmón superficial* (MOSPR), cuya respuesta sensora resultó ser tres veces mayor que la de un SPR convencional. Dicha comparativa fue realizada bajo las mismas condiciones; es decir, mismo sistema experimental (sistema óptico, longitud de onda incidente, sistema de adquisición, sistema de flujo, etc.) e iguales condiciones experimentales en el bioensayo (mismo protocolo de inmovilización del bioreceptor y detección del analito), demostrando con ello que el aumento de sensibilidad se debía unívocamente a la técnica de modulación plasmónica empleada.

Este pionero trabajo demostró el potencial de la modulación magneto-plasmónica como técnica sensora, abriendo la puerta hacia un nuevo campo de investigación en el cual hay muchas interrogantes por resolver. ¿Cuál es la mejor estructura magneto-plasmónica para usar como transductor? ¿Qué material o materiales ferromagnéticos se deberían emplear? ¿Qué longitud de onda incidente se debería elegir? ¿Qué parámetros influyen decisivamente en la sensibilidad y en la respuesta sensora del dispositivo MOSPR? El presente capítulo recoge los resultados y conclusiones más relevantes alcanzadas al respecto durante el desarrollo de esta tesis doctoral. Para resolver dichos interrogantes se ha tenido que realizar un profundo análisis teórico y experimental del dispositivo, centrando

fundamentalmente en el estudio, diseño y optimización de estructuras MP capaces de actuar como transductor del biosensor MOSPR.

## 5.1. Modulación magneto-óptica del plasmón superficial

Hasta ahora se han desarrollado diversas técnicas o métodos de manipulación de plasmones superficiales, algunas de las cuales permiten modular las propiedades de los SPP. Como se comentó en el capítulo anterior, la modulación del SPP requiere de la variación controlada de la constante dieléctrica del metal. De todas las técnicas de modulación presentadas hasta ahora, la basada en efectos magneto-ópticos es una de las que mayor potencial presenta, debido a los numerosos estudios previos que se han realizado a lo largo de más de tres décadas sobre la combinación de efectos magneto-ópticos y plasmones superficiales.

### 5.1.1. Efectos magneto-ópticos

Los efectos magneto-ópticos (MO) son el resultado de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia imanada. Michael Faraday fue el primero en estudiar esta interacción al observar, en 1845 [141], que el plano de polarización de la luz incidente experimentaba una rotación al atravesar un vidrio sobre el cual se aplicaba un campo magnético (campo aplicado en la misma dirección de propagación de la luz). Debido a su naturaleza de transmisión, este fenómeno (denominado *efecto Faraday* en honor a su descubridor) sólo es observable en medios transparentes o semitransparentes. Sin embargo, en 1876 [142], John Kerr observó que la luz reflejada por las piezas polares de hierro de un electroimán también sufría una rotación en su plano de polarización. Kerr observó pequeñas rotaciones proporcionales a la imanación, y no al campo magnético aplicado, siendo esta rotación máxima cuando la imanación alcanzaba su valor de saturación. A diferencia del efecto Faraday, el denominado *efecto Kerr* es observable en cualquier material magnético que cuente con una superficie reflectante.

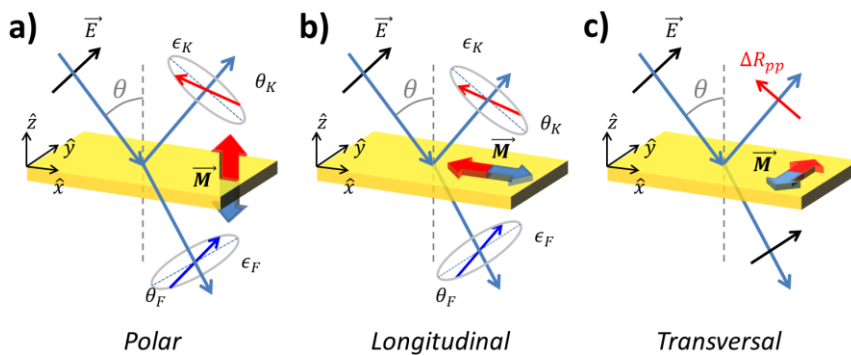


Figura 38– Configuración (a) polar, (b) longitudinal y (c) transversal del efecto Faraday [en transmisión] y Kerr [en reflexión].

Atendiendo a la clasificación Voigt de los efectos MO, existen tres configuraciones en las que se produce efecto Faraday y Kerr, dependiendo de la orientación del vector imanación relativa al plano de incidencia de la luz. Estas son: la *configuración polar*, *longitudinal* y *transversal*.

- Configuración polar: esta se produce cuando la imanación  $M$  es perpendicular a la superficie del medio magnético y además, se encuentra contenida en el plano de incidencia (ver Figura 38-a)). En el caso del *efecto Faraday* la luz gira su plano de polarización un ángulo  $\theta_F$  y adquiere una pequeña elipticidad  $\epsilon_F$  (ambas proporcionales al espesor de la película y a la componente perpendicular de la imanación). En el caso del *efecto Kerr*, la luz reflejada en la dirección normal a la superficie experimenta una rotación  $\theta_K$  y elipticidad  $\epsilon_K$  similar.
- Configuración longitudinal: la producida cuando la imanación  $M$  se encuentra dentro del plano del medio magnético y además, es paralela al plano de incidencia de la luz (ver Figura 38-b)). Dependiendo del estado de polarización de la luz incidente (luz linealmente polarizada  $p^{13}$  o  $s^{14}$ ) la luz reflejada [o transmitida] será luz elípticamente polarizada con su plano de polarización rotado un ángulo  $\theta_K$  [ $\theta_F$ ] y con una elipticidad  $\epsilon_K$  [ $\epsilon_F$ ]. En esta configuración, los efectos MO son, generalmente, menores que en la configuración polar.
- Configuración transversal: en esta última configuración la imanación  $M$  se encuentra contenida dentro del plano del medio magnético y además, es perpendicular al plano de incidencia de la luz (ver Figura 38-c)). La luz linealmente  $s$ -polarizada no sufrirá variación alguna, ya que para que haya interacción MO el campo eléctrico de la onda electromagnética incidente debe tener una componente perpendicular a la imanación. El efecto sobre la luz linealmente  $p$ -polarizada consiste únicamente en una pequeña variación del coeficiente de reflexión, que se traduce en un cambio de la intensidad de la luz reflejada, pero en ningún caso se observa rotación del plano de polarización o elipticidad.

Desde un punto de vista macroscópico, la respuesta electromagnética de un sistema MO se describe mediante los tensores dieléctrico  $\epsilon(\omega)$  y permeabilidad magnética  $\mu(\omega)$ , ambos dependientes de la frecuencia  $\omega$ . A bajas frecuencias existe interacción directa entre el momento magnético del electrón y el campo magnético de la radiación incidente. Sin embargo, a las frecuencias ópticas correspondientes al rango del visible y ultravioleta, el momento de espín no es capaz de seguir las rápidas variaciones del campo y la permeabilidad magnética se puede considerar igual a la del vacío. Por tanto, la descripción formal de los efectos MO se reduce al análisis de la influencia del campo magnético aplicado en el *tensor dieléctrico del medio*. Este último se define como:

<sup>13</sup> Luz  $p$ -polarizada – plano de polarización paralelo al plano de incidencia

<sup>14</sup> Luz  $s$ -polarizada – plano de polarización perpendicular al de incidencia

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_{xx} & \varepsilon_{xy} & \varepsilon_{xz} \\ \varepsilon_{yx} & \varepsilon_{yy} & \varepsilon_{yz} \\ \varepsilon_{zx} & \varepsilon_{zy} & \varepsilon_{zz} \end{pmatrix} \quad (46)$$

En ausencia de campo magnético  $H$ , los materiales presentan un tensor dieléctrico simétrico, es decir, cumpliendo  $\varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ji}$ . La aparición de campo magnético y, como consecuencia, de imanación  $M$  en el material, hace que se rompa la simetría, cumpliéndose que  $\varepsilon_{ij}(M) = \varepsilon_{ji}(-M)$ . Como consecuencia, se deduce que el tensor dieléctrico en un material imanado es asimétrico y que las componentes diagonales del tensor dieléctrico son una función par de la imanación, mientras que las componentes no-diagonales son una función impar de la misma.

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_{xx} & \varepsilon_{xy} & \varepsilon_{xz} \\ -\varepsilon_{xy} & \varepsilon_{yy} & -\varepsilon_{yz} \\ -\varepsilon_{xz} & \varepsilon_{yz} & \varepsilon_{zz} \end{pmatrix} \quad (47)$$

Así, la dependencia de los distintos elementos del tensor dieléctrico respecto de la imanación vendrá dada por la simetría cristalina del material. Esta dependencia se puede describir, hasta el segundo orden, como:

$$\varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ij0} + \sum_k a_{ijk} \cdot M_k + \sum_{kl} b_{ijkl} \cdot M_k \cdot M_l + \dots \quad (48)$$

donde  $\varepsilon_{ij0}$  son los elementos del tensor dieléctrico sin imanación,  $M_i$  las distintas componentes de la imanación (la cual está relacionado con el campo magnético  $H$  a través de la susceptibilidad magnética del medio  $\chi_m$ ,  $\vec{M} = \chi_m \cdot \vec{H}$ ), los elementos  $a_{ijk}$  describen la dependencia lineal con la imanación y los elementos  $b_{ijkl}$  describen la dependencia cuadrática. Por lo tanto, en un **material con simetría cúbica**, con la imanación apuntando en una dirección arbitraria y tras considerar sólo los términos lineales en (48), el tensor dieléctrico puede escribirse como:

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon & a \cdot M_z & a \cdot M_y \\ -a \cdot M_z & \varepsilon & -a \cdot M_x \\ -a \cdot M_y & a \cdot M_x & \varepsilon \end{pmatrix} \quad (49)$$

donde  $\varepsilon = \varepsilon_{xx} = \varepsilon_{yy} = \varepsilon_{zz}$  es la constante dieléctrica en ausencia de imanación y  $a$  es el único coeficiente magneto-óptico lineal en los materiales con simetría cúbica.

Todos los materiales pueden exhibir imanación y, por lo tanto, son susceptibles de tener actividad MO. Sin embargo, el estado de imanación que pueden alcanzar varía enormemente dependiendo del tipo material, pudiéndose distinguir entre materiales con magnetismo débil (diamagnéticos, paramagnéticos) y materiales con magnetismo fuerte (ferromagnéticos, ferrimagnéticos, anti-ferromagnéticos). Los materiales magnéticos débiles poseen una imanación nula en

ausencia del campo magnético. En los materiales paramagnéticos, la aplicación de un campo magnético externo induce una imanación en el mismo sentido del campo aplicado, mientras que en los diamagnéticos la imanación que se induce va en sentido contrario al campo aplicado. Ambos materiales exhiben una dependencia lineal con el campo externo. Los efectos MO en estos materiales son, por norma general, muy débiles y necesitan campos magnéticos muy intensos y/o distancias de propagación en el medio material muy grandes para ser apreciables. En cambio, en los materiales magnéticos catalogados como fuertes, los momentos magnéticos de sus electrones se encuentran ordenados en ausencia de campo magnético y el estado de imanación neta que se puede alcanzar es mucho mayor. Dentro de este grupo, los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos son los más interesantes para aplicaciones MO ya que son los materiales que mayores efectos MO pueden inducir.

### 5.1.2. Efectos magneto-plasmónicos

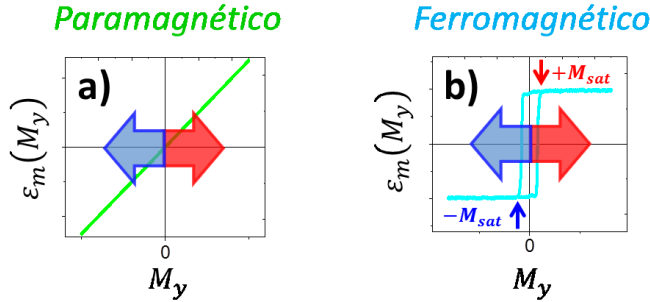
Los fenómenos producidos como consecuencia de la generación de efectos MO en presencia de un plasmón superficial se conocen como **efectos magneto-plasmónicos (MP)**. En 1972, J. J. Brion [143] y K. W. Chiu [144] fueron los primeros en acuñar el término *magneto-plasma* en dos análisis teóricos sobre la interacción entre plasmones superficiales y la imanación en medios semiconductores y metales, respectivamente. Posteriormente, P.E. Ferguson [145] (1977) observó que en láminas delgadas de Fe y de Ni se producía un fuerte aumento de la variación relativa de reflectancia de la componente *p*-polarizada cuando en estas se generaba el TMOKE y, simultáneamente, se excitaba el SPP. Desde entonces gran número de trabajos, teóricos y/o experimentales, han sido publicados al respecto, en su mayoría centrados en el estudio del aumento de los efectos MO producidos por la combinación de plasmónica y magneto-óptica [146–162]. Sin embargo, el aumento de la actividad MO no es la única consecuencia de la combinación de ambos fenómenos. Como ya se comentó en el capítulo anterior, la variación controlada de la constante dieléctrica del metal, posibilitaría la alteración del vector de ondas del SPP y con ella, la modulación de la condición de excitación.

De las tres posibles configuraciones anteriormente descritas, la más interesante a la hora de modular el SPP, es la configuración transversal, ya que en esta configuración la componente de luz reflejada no verá alterada su polarización. Además, este efecto únicamente es observado cuando la luz incidente está *p*-polarizada (la misma con la cual se puede excitar el SPP en una interfase metal/dieléctrico). De esta forma, si en la **configuración Kerr transversal** la imanación es paralela al eje  $\hat{y}$  (como se muestra en la Figura 38-c)), el tensor dieléctrico del medio magnético será de la forma:

$$\varepsilon_m = \begin{pmatrix} \varepsilon & 0 & a \cdot M_y \\ 0 & \varepsilon & 0 \\ -a \cdot M_y & 0 & \varepsilon \end{pmatrix} \quad (50)$$

siendo el valor del tensor dieléctrico del metal función de la imanación del medio y por lo tanto, del campo magnético externo aplicado.

En esta configuración, en el caso de un medio paramagnético y siempre que se hable de campos magnéticos aplicados pequeños ( $< 500$  mT), la dependencia de  $\varepsilon_m$  con la imanación (y por lo tanto, con el campo magnético aplicado) será lineal (ver Figura 39-a)). Mientras que en el caso de materiales ferromagnéticos (como el Fe y el Co), existirá un valor de saturación de campo magnético (uno para cada dirección de imanación), en el cual la muestra estará completamente imanada y  $\varepsilon_m$  ya no podrá variar más aunque se aplique un campo magnético mayor (ver Figura 39- b)).



**Figura 39 – Efecto TMOKE en (a) medios paramagnéticos y (b) en medios ferromagnéticos.**

Consecuentemente, en el caso de una interfase formada por un medio metálico magnético y uno dieléctrico, tales que  $Re(\varepsilon_m) < 0$  y que  $Re(\varepsilon_d) < |Re(\varepsilon_m)|$ , el vector de ondas del SPP generado en dicha interfase dependerá del campo magnético aplicado sobre el metal. En concreto, en el caso de que el tensor dieléctrico de un medio metálico magnético esté descrito por la ecuación ( 50 ), el vector de ondas del SPP será:

$$k_{spp}(\pm M_y) = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m(\pm M_y) \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_d + \varepsilon_m(\pm M_y)}} \quad (51)$$

Si la onda de SPP es generada mediante el acoplamiento por prisma, la condición de resonancia de SPP, variará con el campo magnético aplicado. Esto implica que el ángulo al cual se produce la resonancia de plasmón podrá ser controlado a través de la imanación  $M$  generada en el medio magnético como consecuencia de la aplicación de un campo magnético externo  $H$ .

$$\Rightarrow k_{spp}(\pm M_y) \equiv k_{\parallel}^{luz} = k_0 \cdot \sqrt{\varepsilon_p} \cdot \sin(\theta_{spp}(\pm M_y)) \quad (52)$$

Si en esta configuración, el medio magnético empleado es de tipo ferromagnético, la condición de resonancia del SPP en la configuración de Kretschmann y para  $\lambda = cte$ , será:

$$\Rightarrow k_{spp}(\pm M_{sat}) \equiv k_{\parallel}^{luz} = k_0 \cdot \sqrt{\varepsilon_p} \cdot \sin\left(\theta_{spp} \pm \frac{\Delta\theta_{Mo}(\pm M_{sat})}{2}\right) \quad (53)$$

donde  $\Delta\theta_{MO}$  representa la variación angular (en valor absoluto) de  $\theta_{spp}$  cuando la imanación de la muestra es invertida.

Esto quiere decir, que dependiendo del valor de  $M_y$ , el ángulo de incidencia para el cual se cumple la condición de resonancia del SPP será diferente. Esto se traduce en un desplazamiento angular de la curva de resonancia respecto de la curva de resonancia a campo magnético nulo  $R_{pp}(0)$  (ver Figura 40-a)), generándose una componente de variación de reflectancia  $\Delta R_{pp}$  (ver Figura 40-b)) cuyo máximo estará localizado en el punto de máxima pendiente de  $R_{pp}$ . De esta forma, gracias a la generación simultanea del efecto TMOKE y del SPP en capas ferromagnéticas delgadas, será posible modular el  $k_{spp}$  y generar una curva angular de variación relativa de reflectancia  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  (ver Figura 40-c)). Como se mostró en la Figura 37,  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  permitiría detectar las variaciones del índice de refracción del medio externo.

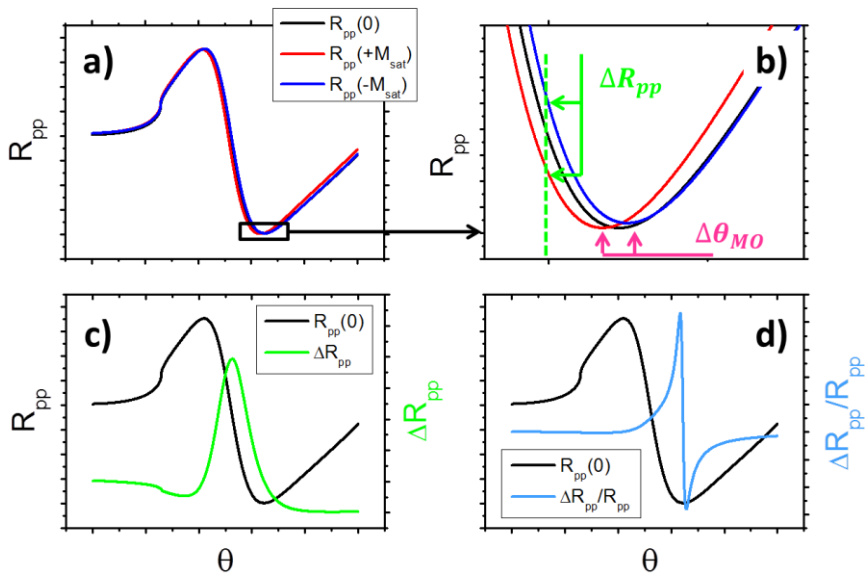


Figura 40 – Modulación magneto-óptica del SPP en configuración de Kretschmann y a longitud de onda constante. Curvas angulares de (a) reflectancia, (b) detalle del mínimo de reflectancia, (c) reflectancia y variación de reflectancia MO y (d) reflectancia y variación relativa de reflectancia MO.

## 5.2. Diseño y fabricación del sensor MOSPR

Debido al hecho de que ambos dispositivos comparten la mayoría de los elementos que los constituyen, el biosensor MOSPR es un firme candidato para lograr una mayor respuesta sensora que el biosensor SPR convencional, manteniendo a la vez las características que hace que el SPR sobresalga por encima del resto de biosensores ópticos (bajo coste, alta sensibilidad, sencillez, versatilidad, medidas en tiempo real y sin ayuda de marcadores, etc.). Tanto es así, que los tres únicos

elementos diferenciadores son: el tipo de *transductor* (plasmónico para el SPR y *magneto-plasmónico* para el MOSPR), la inclusión de un *actuador magnético* (imán, electroimán, bobinas...) y la modificación de la *adquisición y procesamiento de señal*. De esta forma, además de los elementos principales que posee todo sensor SPR de intensidad en configuración de Kretschmann (fuente de luz monocromática linealmente polarizada, prisma de alto índice de refracción y sistema de flujo), el sistema experimental del sensor MOSPR se compondrá de:

- Transductor magnético. Una capa o multicapa con actividad plasmónica y MO en la que poder excitar el efecto transversal MP.
- Actuador magnético con el que imanar y cambiar el estado de imanación de la estructura MP. En nuestro caso un simple electroimán.
- Un sistema de rotación, adquisición y procesamiento de señal que permita determinar la curva angular de reflectancia  $R_{pp}$  y de  $\Delta R_{pp}$ .

Todos los elementos que componen el sistema experimental pueden agruparse en seis bloques constituyentes: *transductor magneto-plasmónico*, *actuador magnético*, *sistema óptico*, *sistema de flujo*, *sistema de adquisición y procesamiento de señal*, y *sistema de control y visualización de datos*. Sin duda, el correcto funcionamiento del dispositivo dependerá del correcto comportamiento individual y colectivo de cada uno de estos bloques. Por esta razón, el diseño y fabricación del sistema experimental es una tarea de suma importancia.

### 5.2.1. Transductor magneto-plasmónico

Una estructura MP es aquella que pueda presentar simultáneamente actividad MO y plasmónica; es decir, que permita la generación de efectos MO y la excitación de un SPP. Como ya se comentó anteriormente, el Au es el candidato ideal para ser utilizado como transductor plasmónico del sensor SPR. Sin embargo, su actividad MO es muy débil [163], lo que descarta su utilización como estructura MP. Por el contrario, los materiales ferromagnéticos (en concreto, las capas ferromagnéticas delgadas) permiten la excitación de SPP y poseen una fuerte actividad MO. Sin embargo, a pesar de que en estos materiales se pueden generar intensos efectos MP, la gran absorción óptica que poseen los materiales ferromagnéticos (ver Apéndice A) produce unas curvas angulares de resonancia muy anchas (como se puede observar en la Figura 41).

Según esto, en los transductores MP resultaría ideal combinar la fuerte actividad MO de los metales ferromagnéticos con la gran actividad plasmónica (intensa y estrecha resonancia) de los metales nobles. La combinación de metales nobles y ferromagnéticos en estructuras de multicapas permite fabricar transductores MP con elevada actividad MO e importante dependencia con el índice de refracción del medio dieléctrico, gracias a la combinación de las intensas y estrechas resonancias de SPP generadas en los metales nobles y a la intensa actividad MO de los metales ferromagnéticos. Además de las propiedades MP de la estructura, como ya se comentó en el apartado 4.2, en los sensores de modulación plasmónica la



optimización del espesor del transductor adquiere una mayor relevancia que en el caso del sensor SPR, ya que la pendiente de detección del sensor MOSPR (la derivada angular de la curva de variación relativa de reflectancia,  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ ) incrementa bruscamente su valor cuando el valor de reflectancia en el ángulo de excitación del SPP tiende a cero; es decir, cuando se maximiza el acoplamiento entre el haz incidente y el SPP.

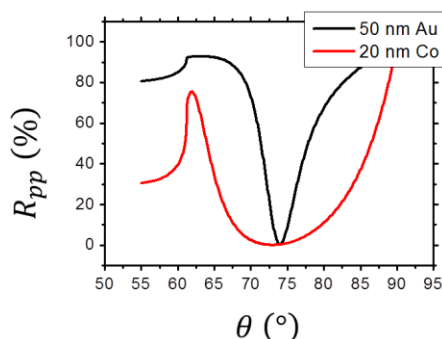


Figura 41 – Curva de resonancia angular generada en una capa de 50 nm de Au y en una de 20 nm de Co cuando se emplea agua ( $n_d=1.3323$  RIU) como medio dieléctrico y  $\lambda=633$  nm.

A la hora de fabricar un transductor para un biosensor plasmónico con acoplamiento por prisma (modulado o no), existirán dos opciones: evaporar el metal o metales directamente sobre la cara plana del prisma o hacerlo sobre un sustrato plano del mismo material que el prisma. Este último procedimiento es el más versátil y barato, ya que los sustratos son más baratos y fáciles de metalizar que un prisma semicircular. Como desventaja, en el caso de depositar el metal o metales sobre un sustrato plano, será necesario utilizar un aceite de acoplamiento óptico<sup>15</sup> entre el sustrato y el prisma para garantizar que la luz llegue hasta la interfase metal/sustrato (ver Figura 42).

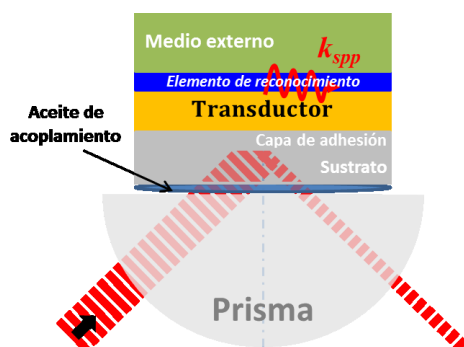


Figura 42 – Esquema del Sistema transductor empleado en esta tesis.

<sup>15</sup> Líquido con igual índice de refracción que el sustrato y el prisma.

Si no se emplease dicho aceite, al existir una capa de aire entre el prisma y el sustrato, a partir de un cierto ángulo (por ejemplo, a partir de un ángulo de incidencia de  $\sim 41.5^\circ$  en el caso de emplear un prisma con  $n_p = 1.51$  RIU) se produciría la reflexión interna total de la luz incidente y la luz nunca podría llegar hasta la capa metálica para excitar el SPP. También resulta necesario emplear una fina capa de algún material que aumente la escasa adhesión existente entre el Au y el vidrio. Suele ser habitual emplear una capa de Cr o Ti, de apenas 1 o 2 nanómetros.

Existen diferentes técnicas de deposición de capas metálicas delgadas (del orden de nanómetros). Las principales técnicas de deposición son: la *evaporación térmica*, la *evaporación por haz de electrones*, la *pulverización catódica* (también conocida como *sputtering*) o la *ablación láser*. En todas ellas, en el interior de una cámara de vacío ( $10^{-4} - 10^{-8}$  mbar), el material deseado es evaporado y posteriormente, condensado sobre el sustrato. Dependiendo de la técnica empleada (la magnitud del vacío alcanzado en el interior de la cámara de evaporación, y la calidad del material y de los sustratos empleados) las propiedades y rendimiento del transductor serán diferentes. Durante esta tesis se han empleado la evaporación por haz de electrones y la pulverización catódica como técnicas de crecimiento de los transductores.

### 5.2.2. Actuador magnético

Las propiedades magnéticas del material ferromagnético empleado no sólo afectan a la respuesta sensora, sino que también determinan las propiedades de algunos de los elementos que componen el sistema experimental, como por ejemplo el actuador magnético. Así, dependiendo del material empleado (Co, Fe, Ni...) y del espesor de la capa ferromagnética, el campo magnético necesario para imanar dicha capa puede variar desde las decenas a los miles de mili Teslas (mT).

En nuestro caso, como actuador magnético se empleó un sencillo electroimán de fabricación propia. Este electroimán estaba formado por un núcleo sólido de hierro dulce en forma de C, sobre el cual se había bobinado un cable de cobre de 0,56 mm de diámetro hasta formar unas 500 espiras (ver Figura 43-a)). Este electroimán es capaz de generar un campo magnético alterno de unos  $\pm 50$  mT cuando por el cable se hace circular una corriente alterna de 2 A y frecuencia inferior a los 100 Hz. Esta corriente de excitación se genera en una tarjeta de adquisición y se amplifica mediante un sencillo amplificador de corriente. Por encima de esa frecuencia, la intensidad de campo magnético generada por el electroimán sufre una gran disminución debido a que el momento magnético del material empleado como núcleo no puede variar su orientación tan rápidamente. Sin embargo, para frecuencias inferiores a los 100 Hz, el campo magnético generado por el electroimán resulta suficiente para alcanzar el valor de saturación de la imanación  $\pm M_{sat}$  de capas delgadas de metales ferromagnéticos en configuración transversal. La Figura 43-b) muestra la evolución temporal de las señales de excitación del electroimán y de la imanación del transductor MP. Como se puede observar, existirá un pequeño retardo entre ambas señales debido al tiempo de respuesta del momento de imanación. Este desfase será proporcional a la frecuencia de la señal de excitación y ha de tenerse presente a la hora de determinar la variación de reflectancia  $\Delta R_{pp}$ .

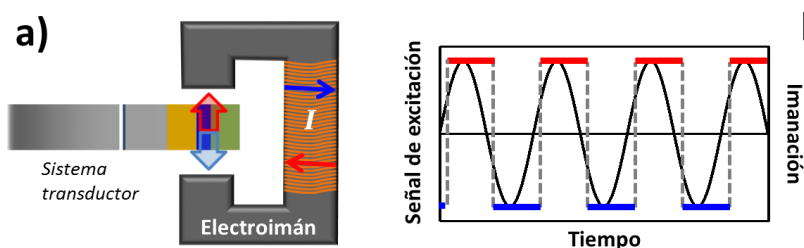


Figura 43 – Esquema de (a) el electroimán empleado en configuración TMOKE y (b) de la señal temporal de excitación del electroimán y de imanación de una estructura MP.

### 5.2.3. Sistema óptico de detección

El sistema óptico puede dividirse a su vez en dos elementos principales: la fuente de luz y elementos ópticos que adecuan el haz incidente (ver Figura 44-a)) y el sistema de excitación y detección del SPP (ver Figura 44-b)). Gracias a la utilización de un divisor de haz, resulta sencillo acoplar diferentes fuentes de luz en un mismo sistema de medida angular, pudiendo así realizar medidas a diferentes longitudes de onda. En nuestro caso, empleamos dos longitudes de onda diferentes que nos permitirán analizar de forma experimental la respuesta del sensor MOSPR a 633 y 660 nm, respectivamente. También, a pesar de que el haz incidente ya se encontraba linealmente polarizado, se empleó un polarizador TM de alto rendimiento para eliminar cualquier componente TE de polarización.

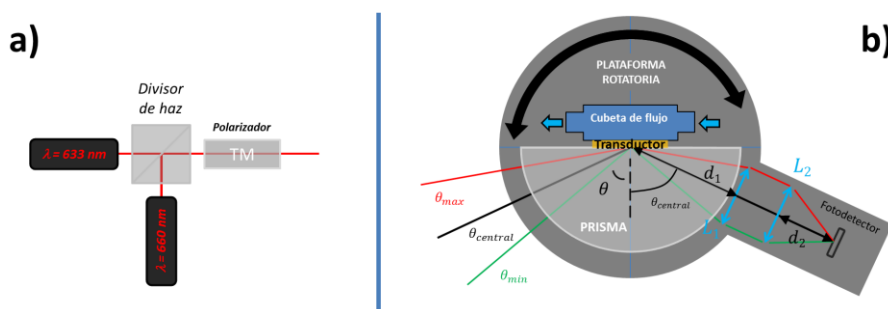


Figura 44 – Esquema del Sistema óptico de detección empleado en el sistema experimental inicial del biosensor MOSPR: (a) Fuentes de luz y (b) sistema de excitación y detección del SPP.

A la hora construir un sistema de medida angular de reflectancia que permita excitar el SPP en configuración de Kretschmann, la opción más sencilla es mediante la utilización de un goniómetro (o sistema  $\theta - 2\theta$ )<sup>16</sup> y un prisma semicircular con alto índice de refracción. Debido a la falta de dispositivos comerciales que se adecuaron a las características exigidas (alta resolución, pequeño tamaño y sistema motorizado) se decidió emplear una interesante alternativa. La idea consiste en sustituir la

<sup>16</sup> En estos sistemas la fuente de luz se encuentra fija, el elemento donde se produce la reflexión rota un ángulo  $\theta$  y el fotodetector rota un ángulo  $2\theta$  respecto al mismo punto de giro.

plataforma de giro  $2\theta$  por un sistema de dos lentes como el indicado en la Figura 44-b). De esta forma, si se eligen adecuadamente las distancias focales y los tamaños de las lentes  $L_1$  y  $L_2$ , será posible que (dentro de un determinado rango de ángulos) el haz reflejado llegue siempre hasta el mismo punto del fotodetector. Por lo tanto, este sistema contará con una única plataforma motorizada sobre la que girarán de forma solidaria: el transductor, el prisma, la cubeta de flujo, las lentes y el fotodetector.

Para el correcto funcionamiento de este sistema óptico, será fundamental que el prisma se encuentre perfectamente centrado respecto al eje de rotación del sistema y que el haz incidente sea reflejado justo en el eje de rotación del sistema. Las distancias focales de las lentes  $L_1$  y  $L_2$  han de ser tales que  $f_1 = d_1$  y  $f_2 = d_2$ , donde  $d_1$  es la distancia desde la lente  $L_1$  hasta el eje de rotación y  $d_2$  la distancia de la lente  $L_2$  al fotodetector. Además, la posición de las lentes ha de ser tal que su eje óptico pase por el centro de rotación del sistema, encontrándose por lo tanto paralelas entre sí. El ángulo central de barrido  $\theta_{central}$  vendrá determinado por la longitud de onda incidente y el índice de refracción de la disolución en la que se encuentra el analito. En el caso de medios acuosos con  $n_d \approx 1.3323 RIU$ , los ángulos  $\theta_{spp}$  a los que se produce la excitación del SPP en función de la longitud de onda incidente son los indicados por la Figura 20. El rango de ángulos barridos  $\Delta\theta = |\theta_{max} - \theta_{min}|$  quedará determinado por la apertura numérica de la lente  $L_1$ , mientras que el  $\Delta\theta$  requerido vendrá impuesto por la longitud de onda incidente seleccionada. Como se vio en la Figura 31-b), cuanto mayor sea  $\lambda$  más estrecha será la curva, y consecuentemente, menor será el  $\Delta\theta$  necesario para obtener la curva angular de resonancia. Finalmente, el fotodetector seleccionado ha de ser adecuado para la longitud de onda incidente y ha de tener un área sensora de tamaño similar al del haz incidente.

#### 5.2.4. Sistema de flujo

El sistema de flujo es de suma importancia a la hora de determinar la respuesta sensora del dispositivo, estableciendo además la velocidad de análisis, reproducibilidad y fiabilidad del sistema biosensor. También resulta fundamental a la hora de comparar dos sistemas o técnicas de detección diferentes, ya que su influencia en el rendimiento del sistema es muy importante.

Como se puede apreciar en la Figura 45, los elementos básicos del sistema de flujo serán: una cubeta de flujo, un circuito, una válvula de inyección con un bucle y una bomba de flujo. El sistema de flujo actúa de la siguiente forma: la bomba de flujo impulsará el buffer<sup>17</sup> continuo por el circuito hasta hacerlo llegar a la válvula de inyección. Una vez allí, si esta se encuentra en posición de carga, el buffer continuará directamente hasta la cubeta de flujo. En la posición de carga, la muestra podrá ser cargada en el bucle de flujo e incorporada en el buffer continuo. En concreto, al pasar la válvula a posición de inyección, el buffer pasará por el bucle y arrastrará la muestra hasta hacerla llegar a la cubeta de flujo. Una vez allí, la muestra interactuará a través de la celda de flujo con las moléculas receptoras inmovilizadas sobre la superficie del

<sup>17</sup> También denominada solución tamponadora o amortiguadora.

transductor. Finalmente, transcurrido el tiempo de estancia en la cubeta (el cual queda determinado por la velocidad de flujo empleada), la muestra saldrá de la cubeta de flujo y será recogida en un contenedor de desechos.

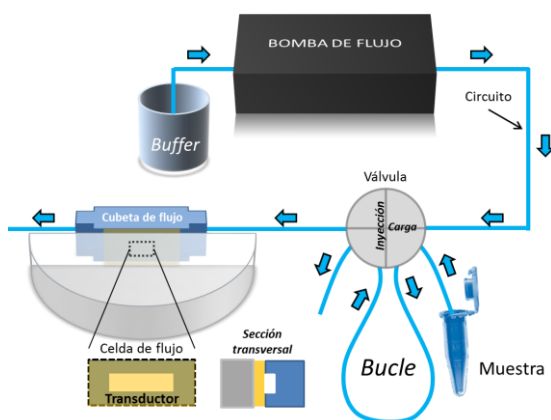


Figura 45 – Elementos principales del Sistema de flujo empleado.

El sistema de flujo ha de cumplir varios requisitos:

- Debe ser químicamente resistente e inerte. Es fundamental que el analito no sea adsorbido por las paredes del sistema de flujo.
- La distancia entre la válvula y la cubeta de flujo ha de ser lo más corta posible para evitar que la muestra se diluya en el buffer por efecto de la difusión.
- La bomba de flujo ha de impulsar el líquido de forma uniforme, manteniendo además constante la velocidad de flujo.
- La cubeta y la celda de flujo han de diseñarse de forma que el flujo permita que los analitos presentes en la muestra entren en contacto con la superficie del transductor. Además, la velocidad de flujo no debe ser demasiado alta, ya que si el analito contenido en la muestra pasa demasiado rápido por la cubeta, este no podrá interaccionar con las moléculas bioreceptoras inmovilizadas en la superficie.

Como se puede apreciar en la Figura 44, la cubeta de flujo formará parte del Sistema óptico de detección y por esta razón, ha de tenerse en cuenta a la hora de diseñar dicho sistema. En concreto, hay que tener en cuenta que el sistema va a rotar y en consecuencia, el circuito tiene que tener margen para ello. También es muy importante que la luz incidente no sobresalga de la celda de flujo, ya que en ese caso existirá un fondo de luz que no se acoplará al SPP, de tal forma que el valor de reflectancia alcanzado en el ángulo de excitación será muy alto y consecuentemente, la variación relativa de reflectancia se verá atenuada.

### 5.2.5. Sistema de adquisición y procesamiento de señal

El tratamiento de la señal influirá decisivamente en la respuesta sensora del dispositivo. Un adecuado diseño del sistema óptico y de flujo proporcionará una alta sensibilidad. Sin embargo, lo realmente importante es la relación entre la sensibilidad y el ruido del sistema. Si el ruido del sistema es demasiado alto, el esfuerzo realizado en aumentar la sensibilidad del transductor no servirá para disminuir el LOD del sensor. El nivel de ruido del sistema dependerá mucho de la calidad del sistema óptico y de flujo. Si ambos no están optimizados se convertirán en fuentes importantes de ruido en el sistema. Por ejemplo, posibles reflejos o interferencias de luz que lleguen hasta el fotodetector, vibraciones mecánicas del sistema de flujo o una celda de flujo inadecuada que genere burbujas en el circuito, podrían disminuir drásticamente el correcto funcionamiento del dispositivo.

El sistema de adquisición del sensor MOSPR es un sistema síncrono, en el que la señal de imanación y la de adquisición han de estar sincronizadas para así poder determinar correctamente la variación relativa de reflectancia  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ . Como ya se comentó anteriormente, existirá un desfase entre la señal de excitación y de imanación. En caso de que la señal de excitación se emplee como señal de disparo (o *trigger*), este desfase debe ser ajustado. En caso contrario, se perderá parte de la señal de modulación. De igual forma, ha de garantizarse que la frecuencia y amplitud de la señal de excitación sean constantes. Respecto al hardware de adquisición, decir que se pueden emplear elementos comerciales o bien, diseñar y fabricar un circuito impreso específico para la aplicación concreta en la que se vaya a emplear. Esta última opción ofrece un mayor rendimiento y bajo coste, pero requiere conocer las características de las señales involucradas y del procesamiento que se va a realizar. La opción de emplear dispositivos comerciales es más cara, pero a la vez más versátil. Además, el tiempo necesario para poner en funcionamiento el sensor será mucho menor. En esta tesis se han empleado ambas estrategias atendiendo al punto de desarrollo en el que nos encontrábamos.

El procesamiento de la señal del biosensor MOSPR será más complejo que la del biosensor SPR. En este caso, la corriente generada por el fotodetector tendrá una componente continua (DC) asociada a la  $R_{pp}$  y una alterna (AC) debida a  $\Delta R_{pp}$ . Consecuentemente, el parámetro  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  se obtendrá de realizar el cociente de ambas señales. Existen dos alternativas diferentes a la hora de procesar la señal que condicionarán el tipo de adquisición: el *procesado hardware* de señal y el *procesado software*. En el procesamiento hardware, si todo el proceso se optimiza adecuadamente, se podrá alcanzar una mejor relación señal a ruido que en el procesamiento software. Sin embargo, este último, destaca por su versatilidad y fácil implementación, así como por su menor precio. En la Figura 46 se puede ver el esquema de operación de ambos procesos. En el procesado hardware, la señal AC y DC se determinan mediante el empleo de un *amplificador Lock-in*<sup>18</sup>. En una etapa previa, se convierte a voltaje (conversor I/V) y se amplifica la señal de corriente proporcionada por el fotodiodo.

---

<sup>18</sup> Un amplificador Lock-in es un sistema síncrono en el que se determina la amplitud de una frecuencia concreta. En este caso, la frecuencia con la que la imanación es invertida.

Posteriormente, mediante una etapa de filtrado, las señales AC y DC son separadas y tratadas de forma independiente. De esta forma, la señal DC es directamente convertida a formato digital para ser enviada al ordenador donde podrá ser almacenada y representada, mientras que la señal AC es enviada a un *amplificador Lock-in* para que este determine la amplitud de la señal, la convierta a formato digital (convertor A/D), y finalmente, envíe este valor al ordenador. En el procesado software, la señal también se convierte a voltaje y es amplificada. Esta señal es enviada a una tarjeta de adquisición, donde se realiza la conversión de señal analógica a digital mediante un convertor A/D. Una vez que la señal ha sido adquirida por el ordenador es posible extraer la magnitud de la frecuencia fundamental (la señal DC asociada a  $R_{pp}$ ) y la amplitud del primer armónico de la señal (la AC asociada a  $\Delta R_{pp}$ ) mediante un análisis de Fourier (FFT) de la misma. Finalmente, existe la posibilidad de realizar un procesamiento híbrido (hardware/software) de señal. Este consiste en combinar ambos procesados, de forma que las señales DC y AC serán previamente separadas (proceso hardware), para posteriormente determinar la amplitud de la señal AC mediante un análisis FFT en vez de con un *amplificador Lock-in* como en el caso del procesado puramente hardware.

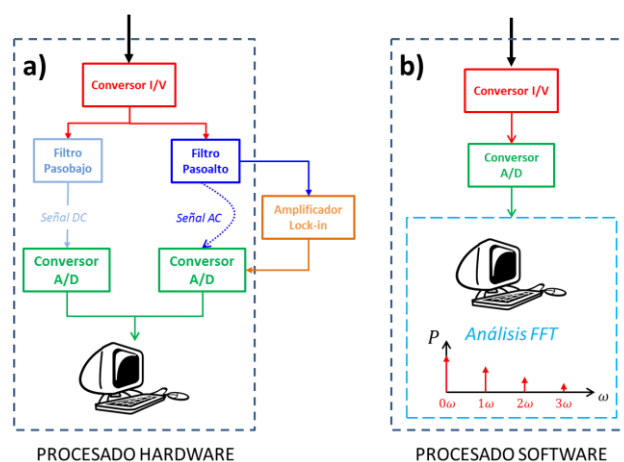


Figura 46 – Esquema de los tipos de procesamiento de señal: (a) hardware y (b) software.

### 5.2.6. Sistema de control y visualización de datos

El programa o software que realice la función de control y visualización de datos no sólo tiene que permitir visualizar las señales recogidas, si no que ha de ser capaz de controlar todos los elementos que componen el sistema (láser, plataforma rotatoria, bomba de flujo, electroimán...) y sobre todo, y más importante, ha de permitir que el usuario interactúe con el sistema. De esta forma, gracias al software, se podrá seleccionar la amplitud y frecuencia de modulación, controlar la ganancia aplicada a la señal, la región y resolución angular de las curvas angulares, la frecuencia de muestreo, el tiempo de adquisición de las medidas angulares, etc. También pueden automatizarse determinados cálculos, como la determinación de la derivada angular de las curvas o el cálculo de variables asociadas a la cinética de la interacción

(constantes de asociación o disociación). Igualmente importante será el almacenamiento de las medidas y de las condiciones de medida empleadas en cada ensayo.

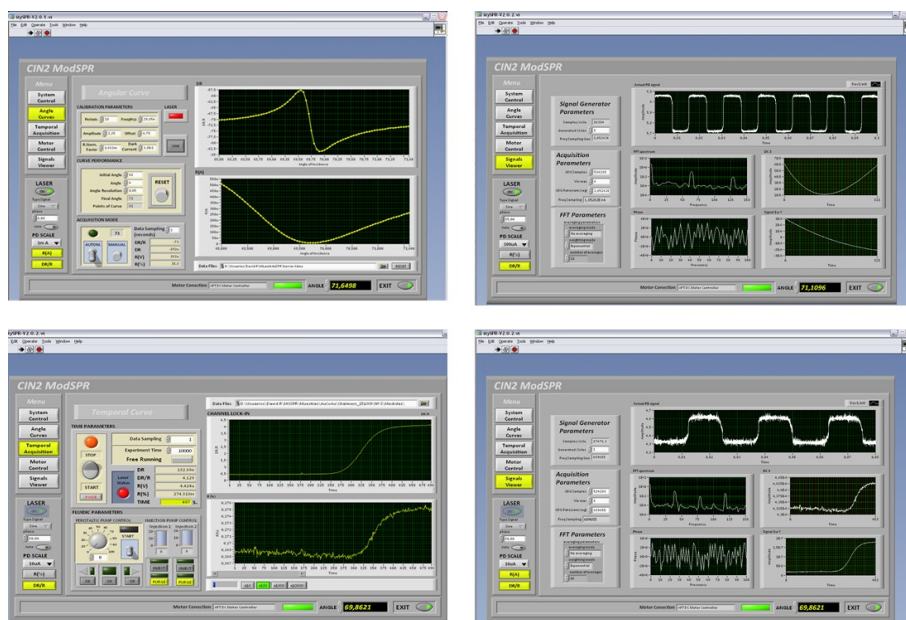


Figura 47 – Capturas de pantalla de los programas de control y visualización de datos empleados durante esta tesis. En la parte superior, en función del ángulo y en la parte inferior, en función del tiempo.

El software desarrollado durante esta tesis fue implementado en la plataforma de desarrollo *Labview*. Dicho software permite al usuario gestionar y controlar las medidas mediante una interfaz gráfica. Esta interfaz se compone fundamentalmente de una ventana en la que se muestran las curvas y parámetros relacionados con las medidas angulares, y otra ventana centrada en las medidas temporales. Una tercera ventana muestra determinados parámetros en tiempo real (como la señal adquirida, su FFT...). El software está diseñado de tal forma que el usuario pueda configurar, visualizar y analizar las medidas (tanto angulares como temporales) de una forma rápida y sencilla. En el caso del procesado software descrito en el apartado anterior, el software también es el encargado de procesar la señal.

### 5.2.7. Montaje experimental preliminar

En la Figura 48 se muestra el esquema básico del sistema experimental inicialmente desarrollado, en el que se observan algunos de los elementos anteriormente descritos. Una ventaja de este sistema experimental modular es que puede fácilmente actuar como sensor SPR. Para ello únicamente se tiene que emplear un transductor plasmónico, analizar su curva angular de reflectancia  $R_{pp}$  y monitorizar su evolución temporal. Se intentó que el primer sistema experimental construido fuera lo más versátil posible para, posteriormente, poder modificarlo y mejorarlo. Su cometido principal era permitir el análisis y optimización de la sensibilidad del



biosensor MOSPR. Por esta razón, el sistema fue montado sobre una mesa óptica, lo que permite una rápida y fácil modificación del sistema. Los elementos principales del primer sistema experimental desarrollado (ver Figura 49) son los indicados en la Tabla 4. Además de los elementos indicados en esta tabla, este sistema experimental contaba con: un amplificador Lock-in (REF – Mod. 7265 de *Signal Recovery*), empleado en las medidas experimentales del apartado 5.3.1; una tarjeta de adquisición (REF – PCI-6251 de *National Instrument*) y ordenador (REF – Intel Core 2 6400 a 2.13 GHz y con una memoria RAM de 1 Gb), estos últimos empleados a lo largo de toda esta tesis doctoral. En este caso, el procesamiento de señal del sistema era totalmente hardware.

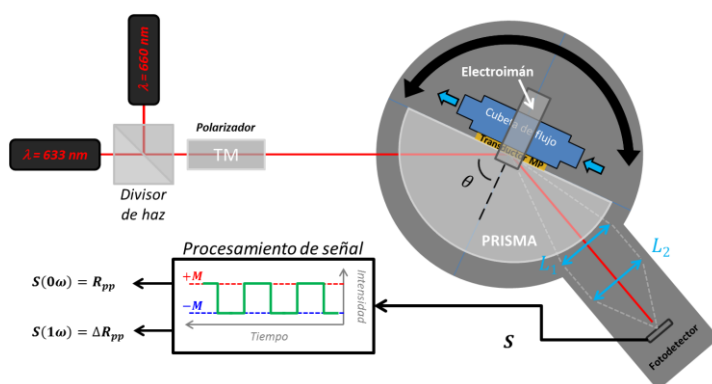


Figura 48 – Capturas de pantalla de los programas de control y visualización de datos empleados durante esta tesis. En la parte superior, en función del ángulo y en la parte inferior, en función del tiempo.

Tabla 4– Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 49.

No.	ELEMENTO	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
1	Láser He-Ne (633 nm)	25-LHP-151-230 <sup>i</sup>	P = 5 mW, Ø = 0,8 mm y divergencia 1mrad.
2	Diodo láser (660 nm)	ML101J27 <sup>ii</sup>	Un sistema LTC100-B <sup>iii</sup> nos permite controlar y estabilizar en temperatura el diodo láser. Para colimar el haz se utiliza una lente con una distancia focal de 3 mm (A414TM-B <sup>iii</sup> ).
3	2x Espejos	PF10-03-P01 <sup>iii</sup>	Montados sobre plataformas cinemáticas (KCB1 <sup>iii</sup> ).
4	Divisor de haz	CM1-BS2 <sup>iii</sup>	Permite emplear dos haces diferentes en el mismo sistema, dividiendo la potencia del haz incidente al ~50 %.

5	Polarizador	GTH10M <sup>III</sup>	Montado sobre una plataforma rotatoria que permite ajustar el eje de polarización (CRM1L/M <sup>III</sup> ).
6	Diafragma	SM1D12 <sup>III</sup>	En este punto del sistema pueden colocarse diferentes filtros ópticos para adecuar la potencia del haz incidente.
7	Soporte	-	Soporte de metacrilato específicamente diseñado y fabricado para fijar la cubeta y el electroimán sobre la plataforma rotatoria.
8	Plataforma rotatoria	CR1/M-Z6E <sup>III</sup>	Plataforma motorizada con un posicionador XY (2x MT1/M <sup>III</sup> ) sobre ella, el cual permite posicionar la celda sobre el eje de rotación.
9	Lentes	L1 – LA1422 <sup>III</sup> L2 – LA1608 <sup>III</sup>	f = 4 mm f = 7,5 mm
10	Fotodetector	SM05PD1A <sup>III</sup>	-
11	Electroimán	-	Ver apartado 5.2.2.
12	Válvula de inyección	Model 5020 <sup>IV</sup>	-
13	Bomba de flujo	Minipulse 3 <sup>V</sup>	Bomba peristáltica de 2 canales.
14	Tarjeta de adquisición + amplificador de corriente	-	Tanto la tarjeta como el amplificador de corriente que alimenta el electroimán fueron específicamente diseñados y fabricados para este sistema.

<sup>I</sup> Melles-Griot – <https://www.cvimellesgriot.com/>      <sup>III</sup> Thorlabs – <http://www.thorlabs.de/>

<sup>II</sup> Mitsubishi Electric – <http://www.mitsubishielectric-mesh.com/products/pdf/ml1xx27.pdf>

<sup>IV</sup> Rheodyne – <http://www.rheodyne.com/>

<sup>V</sup> Gilson, Inc. – <http://www.gilson.com/>

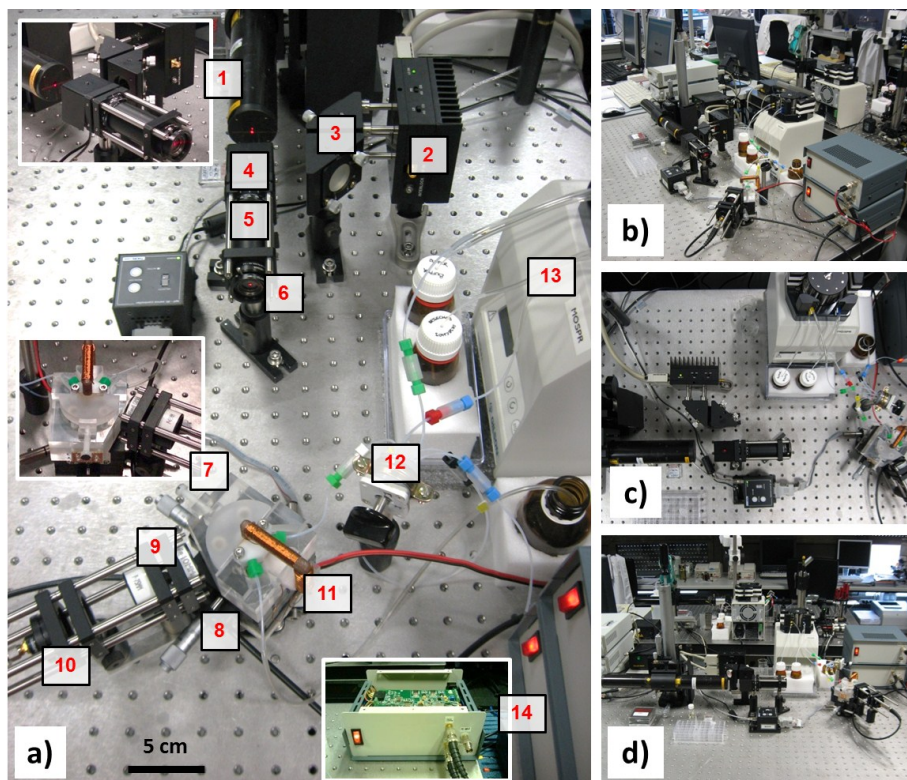


Figura 49 – Sistema experimental MOSPR empleado en el apartado 5.2.7 de esta memoria de tesis doctoral. (a) Vista lateral en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos. Vistas (b) general, (c) cenital y (d) frontal del sistema experimental.

### 5.3. Análisis y optimización de la sensibilidad

Una vez diseñado y montado el sistema de medida experimental, se estará en condiciones de afrontar el análisis y optimización de la respuesta sensora del biosensor MOSPR. Sin duda, el parámetro que más influye en la respuesta sensora será el tipo de transductor empleado; es decir, el tipo de estructura y materiales empleados. De ahí, que lo primero que se debe hacer es analizar las propiedades biosensoras de diferentes transductores MP y posteriormente, la dependencia de estos con la longitud de onda. Uno de los mayores retos a los que se tuvo que hacer frente, es el hecho de que el transductor MP se debe trabajar en un medio acuoso salino y que además, se verá expuesto tanto a disoluciones ácidas como básicas. Esto limita las posibilidades de diseño, ya que los materiales ferromagnéticos son muy reactivos y por lo tanto, tienden a oxidarse y a perder sus propiedades magnéticas con relativa facilidad. Es por esto que, además de que la última capa de la estructura de multicapas nunca podrá ser ferromagnética (condición que también imponía la conveniencia de utilizar Au como superficie sobre la que inmovilizar los elementos de reconocimiento), la distancia entre la/s capa/s ferromagnética/s al medio externo debe ser suficiente como para que esta no se vea atacada.

### 5.3.1. Propiedades magneto-plasmónicas de tricapas Au/Fe/Au

Nuestro análisis comienza estudiando, de forma experimental, la posibilidad de usar Fe como material ferromagnético en un transductor MP. Debido a la mejor capacidad de adhesión entre el Au y el Fe respecto a la del Co, unido a su menor anisotropía magnética, hace que resulte muy interesante estudiar las propiedades de estructuras de multicapas Au/Fe.

Para este propósito se ha optado por emplear una estructura en forma de tricama Au/Fe/Au, como la indicada en la Figura 50. Para evaluar las propiedades MP de dicho transductor, se depositaron dos conjuntos de tricapas Au/Fe/Au sobre un sustrato de vidrio BK7 de 400 micras de espesor ( $n_p = 1,516 RIU$ ), previamente recubierto con 2 nm de Cr para mejorar así la adherencia entre la tricama y el sustrato. El estudio se focaliza en la influencia de la posición de la capa de Fe con respecto al medio externo, determinada por el espesor de la capa superior de Au ( $d_{Au_{top}}$ ), y en la influencia del espesor de la capa de Fe ( $d_{Fe}$ ) en las propiedades MP de la estructura Au/Fe/Au. La deposición se realizó mediante *sputtering* magnetrón a temperatura ambiente y en el interior de una cámara de ultra-alto vacío a una presión de  $10^{-9}$  mbar. En los dos conjuntos de muestras el espesor de la capa inferior de Au, la que está en contacto con el sustrato, se mantuvo constante ( $d_{Au_{bottom}} = 5$  nm). De esta forma, la distancia entre la capa de Fe y el sustrato permaneció constante, permitiendo únicamente variar los espesores  $d_{Au_{top}}$  y  $d_{Fe}$  (ver Figura 50). Para cada uno de los conjuntos de tricapas, el espesor de la capa de Fe se mantuvo constante  $d_{Fe} = 3$  nm y  $d_{Fe} = 5$  nm, mientras que el espesor de la capa superior de Au se varió entre 26 y 36 nm. De esta forma se ajustó de forma experimental el espesor óptimo o de corte de la estructura Au/Fe/Au (el que optimiza la resonancia). Su valor teórico, calculado a través del MMT (ver Apéndice B), se encuentra en torno a los 30 nm para ambas estructuras. Sin embargo, este valor es aproximado ya que no se están teniendo en cuenta el efecto de las distintas interfases, así como el de la rugosidad superficial. Por esta razón es necesario ajustar experimentalmente dicho valor creciendo una serie de muestra en torno al valor teórico. De esta forma, se tendrán dos conjuntos de tricapas:

- Set 3 nm Fe: 28 – 36 nm  $Au_{top}$  / 3 nm Fe / 5 nm  $Au_{bottom}$
- Set 5 nm Fe: 26 – 34 nm  $Au_{top}$  / 5 nm Fe / 5 nm  $Au_{bottom}$

En este estudio, como fuente de luz se empleó un láser He-Ne (633 nm). El efecto TMOKE fue generado gracias a un pequeño electroimán colocado en configuración transversal, el cual generaba un campo magnético alterno de ( $\pm 30$  mT) a una frecuencia de 18 Hz. La señal alterna fue procesada mediante un amplificador *Lock-in*, mientras que la señal continua fue procesada mediante una tarjeta de adquisición específicamente fabricada para tal propósito (procesado hardware). Gracias al sistema de flujo implementado, como medio externo se empleó agua desionizada con un  $n_d = 1,3323 RIU$ .

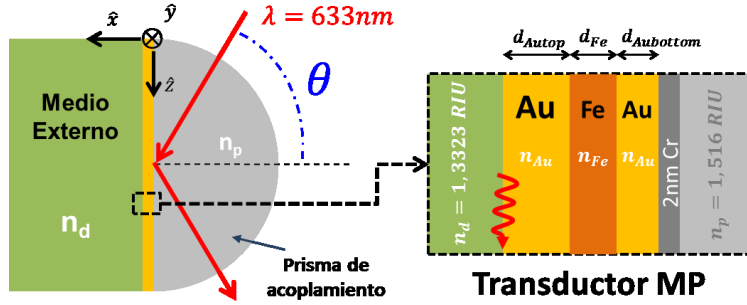


Figura 50 – Vista esquemática de las condiciones y el transductor magneto-plasmónico empleado en este apartado.

Como ya se dijo,  $\Delta R_{pp}$  proporciona acceso al valor de la derivada angular de la curva de reflectancia  $R_{pp}$  (ver ecuación (45) de la pág. 66). Ambos parámetros,  $\Delta R_{pp}$  y  $\partial R_{pp}/\partial \theta$ , están relacionados a través de la variación de reflectancia angular MO, definida como  $\Delta \theta_{MO} = \theta_{spp}(+M_{sat}) - \theta_{spp}(-M_{sat})$ .

$$\Delta R_{pp} = \frac{\partial R_{pp}}{\partial \theta} \cdot \Delta \theta_{MO} \quad (54)$$

Por lo tanto, la determinación experimental de  $\Delta R_{pp}$  y  $\partial R_{pp}/\partial \theta$  proporcionará el valor de  $\Delta \theta_{MO}$ , el cual define las propiedades MP de la estructura analizada. La Figura 51 muestra el excelente ajuste experimental entre ambas curvas, mientras que la inferior muestra los valores experimentales de  $\Delta \theta_{MO}$  obtenidos para cada tricapa. Según se observa, para un espesor constante  $d_{Fe}$ ,  $\Delta \theta_{MO}$  disminuye a medida que  $d_{Autop}$  se incrementa. Además, se puede observar como  $\Delta \theta_{MO}$  aumenta su valor (de forma proporcional dentro de los espesores analizados) con el espesor de la capa ferromagnética. Este comportamiento está relacionado con la distribución de campo electromagnético en el interior del metal, y en particular, con el hecho de que el campo electromagnético decaiga de forma exponencial. De esta forma, cuanto menor sea el espesor de la capa superior de Au, más próxima a la interfase metal/dieléctrico se encontrará la capa ferromagnética y por lo tanto, mayor será el campo electromagnético en el interior de esta capa, generándose una mayor modulación MO. Al encontrarnos lejos de la interfase metal/dieléctrico, la dependencia de la intensidad de campo electromagnético es prácticamente lineal con la distancia, como se puede ver en la Figura 51. El hecho de encontrarnos lejos de dicha interfase no es casual, ya que las tricapas fueron diseñadas para que el Fe estuviera protegido por al menos 30 nm de Au, evitando con ello la posible oxidación de la capa de Fe.

Una vez analizada la influencia del espesor y la posición de la capa ferromagnética en la actividad MO de una tricapa, se analiza su influencia en las propiedades MP de la tricapa, que es la variable determinada por el biosensor MOSPR. La Figura 52 muestra cómo para un valor constante de  $d_{Fe}$ , contrariamente a lo que cabría esperar, el mayor incremento del efecto TMOKE producido cuando se

alcanza la condición de resonancia del SPP<sup>19</sup>, denotado como  $(\Delta R/R)_{max}$ , se produce para un valor de  $d_{Autop}$  diferente del que produce el mayor  $\Delta\theta_{MO}$ . En concreto, para el set de 3 nm de Fe el máximo  $(\Delta R/R)_{max}$  se produce cuando  $d_{Autop} = 30$  nm, mientras que para el set de 5 nm se produce para un espesor  $d_{Autop} = 32$  nm.

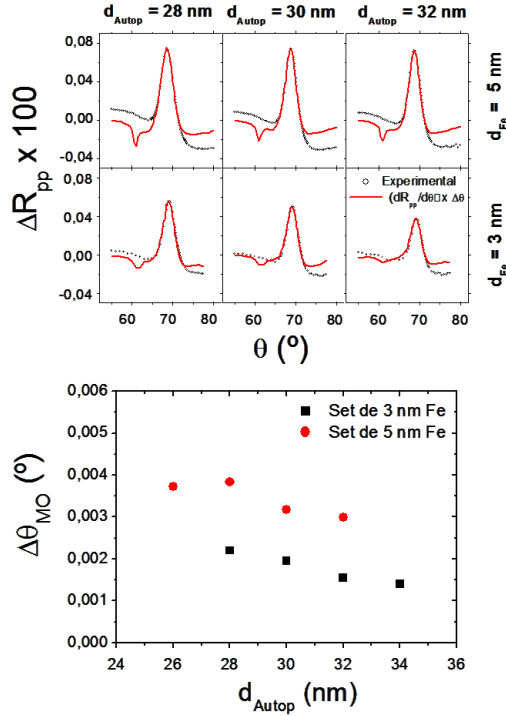


Figura 51 – (Arriba) Comparativa experimental, para 3 muestras representativas de cada set, entre  $\Delta R_{pp}$  y la derivada angular de  $R_{pp}$  multiplicada por su correspondiente factor  $\Delta\theta_{MO}$ . (Abajo) El  $\Delta\theta_{MO}$  experimentalmente obtenido para cada una de las tricapas Au/Fe/Au fabricadas.

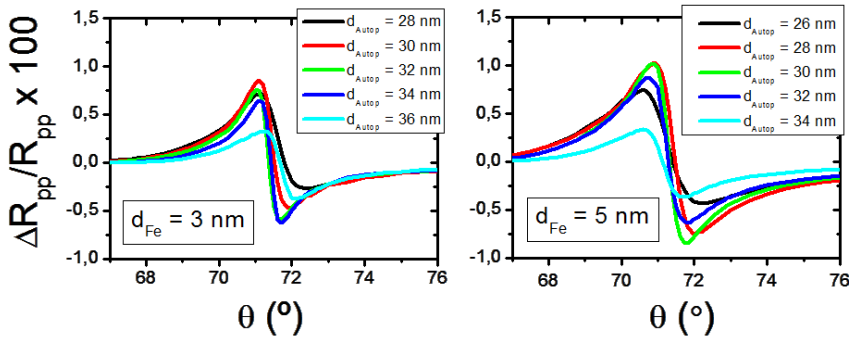


Figura 52 – Curvas  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  experimentales para (izquierda) el set de 3 nm de Fe y (derecha) el set de 5 nm Fe.

<sup>19</sup>  $(\Delta R/R)_{max}$  se define como el módulo de la diferencia entre los valores máximos y mínimos de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ .

La Figura 53 muestra claramente cómo, para cada conjunto de tricapas, el máximo valor de  $(\Delta R/R)_{\max}$  (Figura 53-a)) se alcanza justo para el espesor de  $d_{\text{Autop}}$  que optimiza la resonancia (Figura 53-c)). Además para ese espesor, la pendiente de la curva angular  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  alcanza su máximo valor (Figura 53-b)). Finalmente, comparando estructuras con el mismo espesor  $d_{\text{Autop}} = 30 \text{ nm}$ , pero diferente  $d_{\text{Fe}}$  (Figura 53-d)), se puede ver cómo el espesor de Fe influye determinantemente en la anchura de la curva angular de reflectancia  $R_{pp}$ .

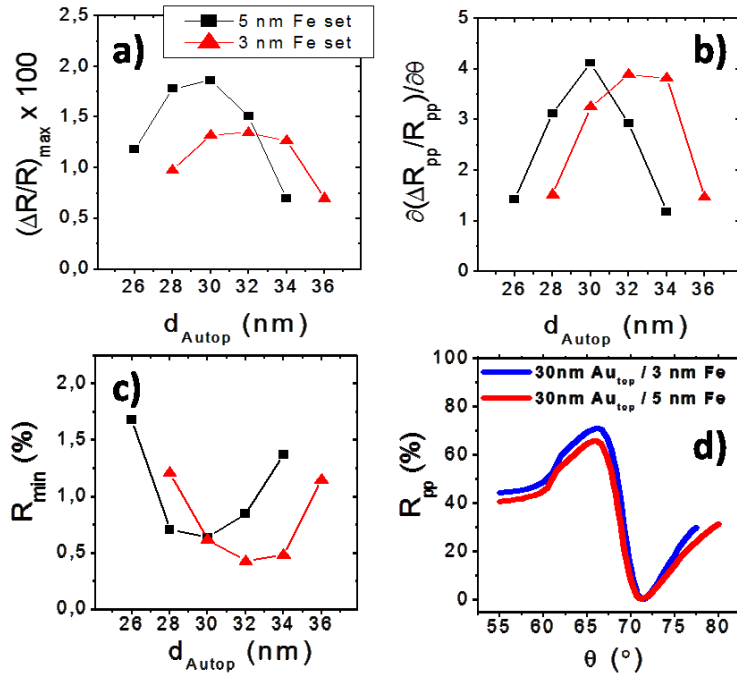


Figura 53 – Valores experimentales de: (a) incremento de TMOKE  $(\Delta R/R)_{\max}$ , (b) pendiente de medida de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  (su derivada en  $\theta_{\text{spp}}$ ), (c) mínimo valor de reflectancia ( $R_{pp}$  ( $\theta = \theta_{\text{spp}}$ )) para todas las estructuras fabricadas y como función del espesor de la capa superior de oro  $d_{\text{Autop}}$ . (d) curvas angulares de reflectancia para dos espesores de Fe situados a la misma distancia de la interfase metal/dieléctrico.

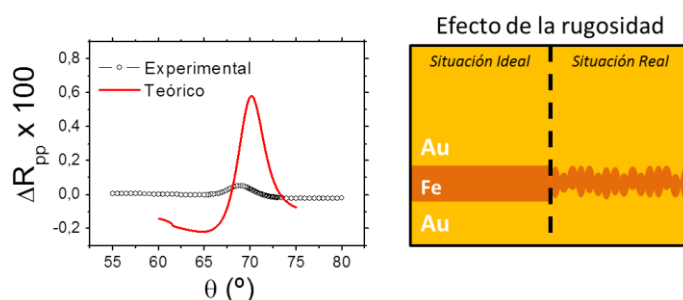
En definitiva, se ha demostrado como:

- Una mayor cantidad de Fe (un mayor espesor de  $d_{\text{Fe}}$ ) produce un aumento de la absorción óptica de la tricapa, la cual ensancha la resonancia angular, y consecuentemente la curva angular  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ .
- Por otro lado, una mayor cantidad de Fe producirá una actividad MO mayor en la tricapa, y consecuentemente una mayor modulación del SPP (mayor  $\Delta\theta_{\text{MO}}$ ). Por lo tanto, se puede concluir que la elección del espesor de la capa ferromagnética obedecerá a un compromiso entre la absorción óptica y la actividad MO generada por esta capa en la estructura MP.



- Observando con detalle la Figura 53 se puede ver cómo, para los espesores de Fe investigados, el incremento de la anchura de la curva de resonancia angular producido por el aumento de  $d_{Fe}$  es compensado por el aumento de su actividad MO, generándose curvas  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  con mayor pendiente y mayor incremento del efecto TMOKE.

Este estudio experimental sugiere que sería necesario estudiar la influencia de la posición y espesor de la capa ferromagnética en la sensibilidad de este tipo de estructuras MP. Sin embargo, a pesar de que experimentalmente se ha podido comprobar la buena resistencia química y estabilidad de los transductores MP constituidos por tricapas Au/Fe/Au, también se ha comprobado que el valor  $\Delta R_{pp}$  experimental obtenido es 10 veces más pequeño que el predicho por la teoría (ver Figura 54). Esta drástica disminución puede deberse a la rugosidad de las interfases Au/Fe, la cual genera una región donde el Au y Fe coexisten (ver Figura 54). Estas regiones pueden ser interpretadas como capas intermedias (aleaciones) cuyas propiedades MO difieren de las del Fe puro, produciéndose una disminución de la actividad MO de la tricapa [164] y por lo tanto, de su actividad MP. De esta forma, la mayor adhesión existente entre el Au y Fe tiene como desventaja la generación de una región en la que ambos materiales coexisten, disminuyendo la actividad MO de la estructura.



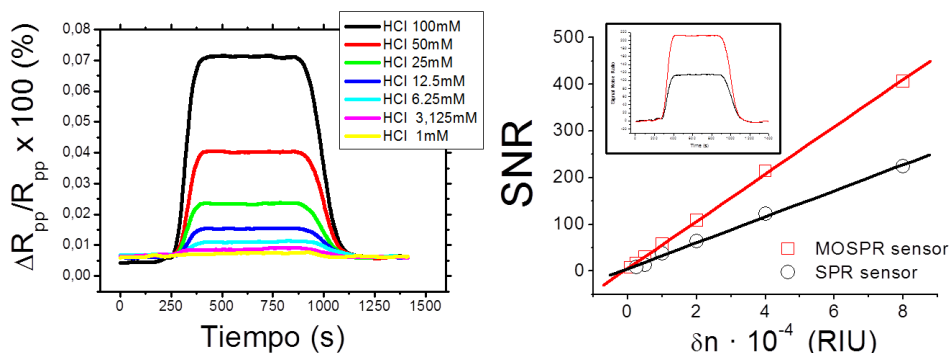
**Figura 54 – (Izquierda) Curva angular de  $\Delta R_{pp}$ , experimental y teórica, de una estructura Au/Fe/Au con ( $d_{Au_{top}} = 30$  nm,  $d_{Fe} = 5$  nm y  $d_{Au_{bottom}} = 5$  nm). (Derecha) Ejemplo esquemático de la *situación ideal* supuesta en los cálculos teóricos (interfases planas) y de la *verdadera situación* (interfases rugosas) causante de la gran disminución experimental observada en las tricapas Au/Fe/Au.**

Finalmente, para concluir el estudio experimental de las propiedades MP de estructuras Au/Fe/Au, se analiza la respuesta sensora de estas estructuras a los cambios de índice de refracción producidos en el medio externo, comparando el resultado obtenido con la respuesta experimentada por un biosensor SPR de intensidad. Como transductor MP se empleó una estructura con espesores  $30\text{ nm Au}_{top}/5\text{ nm Fe}/5\text{ nm Au}_{bottom}$ , ya que esta posee la mayor pendiente angular en su curva de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  de todas las anteriormente analizadas. Como transductor plasmónico del biosensor SPR se utilizó una capa de Au de  $48\text{ nm}$ , por ser este espesor de Au el que optimiza la resonancia para  $\lambda = 633\text{ nm}$ . Ambos transductores fueron crecidos sobre el mismo tipo de sustrato (vidrio BK7 de 400 micras de espesor) y empleando la misma técnica y condiciones de deposición (*sputtering* magnetrón), habiendo previamente depositado sobre el vidrio una capa de  $2\text{ nm}$  de



Cr con el objetivo de incrementar la adhesión entre el transductor y el sustrato. La caracterización experimental fue realizada sobre el mismo sistema experimental (el descrito en el apartado 5.2.7), empleando para ambos sensores las mismas condiciones experimentales y disoluciones de variación del índice de refracción del medio externo.

Debido a la diferente naturaleza de las señales de ambos sensores, la comparación deberá realizarse a través de su relación SNR, como ya se comentó anteriormente. Así, se tomó como ruido del sistema la desviación cuadrática media de la señal experimental adquirida durante 1000 s a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, cuando el medio externo  $n_d$  permanece invariante. Los cambios de índice de refracción volumétricos ( $\delta n$ ) fueron generados mediante 6 disoluciones acuosas de distintas concentraciones de HCl (entre 1 y 50 mM), equivalentes a cambios de índice de refracción entre  $1 \cdot 10^{-5}$  y  $8 \cdot 10^{-4}$  RIU. Como indica la Figura 37, el ángulo de medida de cada biosensor será aquel en el que la curva angular posee la máxima pendiente de detección. Los resultados experimentales obtenidos (ver Figura 55) demuestran que el biosensor MOSPR con transductor MP Au/Fe/Au con la estructura anteriormente indicada, posee una respuesta sensora dos veces mayor que la del biosensor SPR ante los mismo cambios de índice de refracción.



**Figura 55 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR (30nm Au<sub>top</sub>/5nm Fe/5nm Au<sub>bottom</sub>) y del SPR (48 nm Au) ante los mismos cambios de índice de refracción. (Izquierda) Variación temporal de la señal MOSPR para diferentes  $\delta n$  y (derecha) gráfica comparativa de la respuesta sensora de ambos biosensores. En la figura recuadrada se muestra la respuesta temporal (SNR) de ambos sensores ante un mismo cambio de índice de refracción ( $\delta n = 2 \cdot 10^{-4}$  RIU).**

A pesar de demostrar que la respuesta sensora del transductor Au/Fe/Au es mayor que la del biosensor SPR convencional, esta es inferior a la anteriormente alcanzada con una estructura Au/Cr/Co/Cr/sustrato [140]. Esto puede achacarse a que la actividad MO de la estructura Au/Fe/Au fabricada era muy inferior a la esperada teóricamente debido a la forma en la que el Fe crece sobre el Au. Se determinó experimentalmente (ver Figura 56) que la actividad MO de una estructura Au/Co/Au era más de dos veces superior que la de una Au/Fe/Au con iguales espesores. En las estructuras Au/Co/Au la división entre las regiones metálicas y ferromagnéticas es muy abrupta generando una menor adhesión, pero también una mayor actividad MO (ver Figura 56-a)) y consecuentemente, una mayor respuesta sensora (ver

Figura 56-b)). Por esta razón, a la hora de estudiar la sensibilidad experimental de los transductores MP, se decidió emplear estructuras MP formados por multicapas de Au/Co.

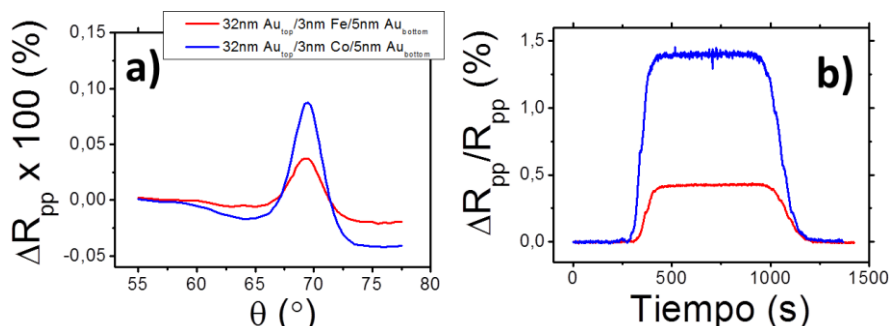


Figura 56 – (a) Curvas angulares de  $\Delta R_{pp}$  y (b) respuesta sensora ante un cambio de índice de refracción volumétrico  $\delta n = 8 \cdot 10^{-4}$  RIU para dos tricapas MP Au/Fe/Au y Au/Co/Au con idénticos espesores.

### 5.3.2. Estudio teórico/experimental de la sensibilidad de estructuras de multicapas Au/Co

Según lo determinado en el apartado anterior, las estructuras MP óptima para ser empleada como transductor del biosensor MOSPR se encontrará localizada entre dos extremos: una capa puramente plasmónica con buenas características plasmónicas (intensa y estrecha resonancia), y una capa puramente ferromagnética con una alta actividad MO. El objetivo del siguiente estudio teórico/experimental será analizar y optimizar la sensibilidad de estructuras de multicapas formadas por metales nobles y ferromagnéticos cuando estas son empleadas como transductores MP de un biosensor MOSPR.

La estructura analizada será la indicada en la Figura 57. Como metal noble se continuará utilizando Au, mientras que como material ferromagnético se va emplear Co en lugar de Fe, ya que es necesario que las capas ferromagnéticas tengan un espesor bien definido a la hora de estudiar la influencia de su posición y espesor en las propiedades de la multicapa.

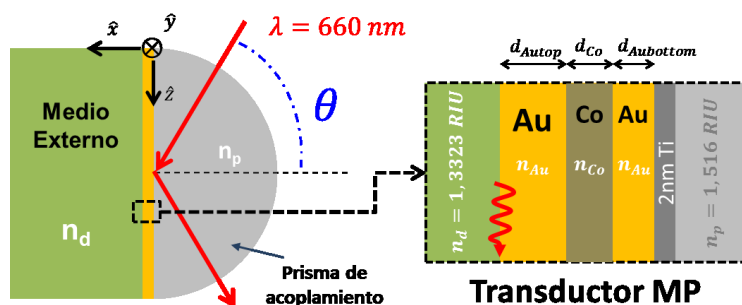


Figura 57 – Vista esquemática de las condiciones y el transductor magneto-plasmónico empleado en este apartado.

En un biosensor SPR de intensidad, el parámetro *Sensibilidad*  $\mathcal{S}_{SPR}^R$  (definido por la ecuación (40)), la pendiente angular de la curva angular de reflectancia y su desplazamiento ante los cambios de índice de refracción del medio externo están relacionados por la siguiente ecuación:

$$\eta_{SPR}^R(\lambda) = \frac{\delta R_{pp}(\lambda)}{\delta n} = \frac{\partial R_{pp}}{\partial \theta} \cdot \frac{\partial \theta_{spp}}{\partial n} \quad (55)$$

Puede concluirse que la máxima sensibilidad de un biosensor SPR de intensidad se producirá cuando el transductor combine una gran pendiente angular en su curva de resonancia (pendiente de detección) y un gran desplazamiento angular de la condición de resonancia ante los cambios de índice de refracción del medio externo.

### 5.3.2.1. Análisis teórico

Para estudiar y optimizar la sensibilidad teórica del biosensor MOSPR, se define el siguiente parámetro, denominado *Sensibilidad del biosensor MOSPR*:

$$\eta_{MOSPR} = \frac{\delta(\Delta R_{pp})}{\delta n} \text{ evaluada en } \theta = \theta_{spp} \quad (56)$$

Por lo tanto, la *sensibilidad*  $\eta_{MOSPR}$  quedará determinada por la variación experimentada por  $\Delta R_{pp}$  ante un cambio de índice de refracción del medio externo, evaluada en el ángulo de excitación del SPP. El hecho de evaluar este parámetro en  $\theta_{spp}$  es clave, ya que es en ese ángulo donde se produce el máximo de la derivada angular de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  y por lo tanto, será el ángulo de medida del biosensor MOSPR. Otro aspecto clave en los biosensores plasmónicos (modulados o no) basados en configuración de Kretschmann, es la eficiencia de acoplamiento del SPP y, por tanto, la intensidad de campo electromagnético alcanzada en la interfase metal/dieléctrico. Ambos parámetros dependen drásticamente del espesor de la capa o multicapa metálica. El acoplamiento óptimo y consecuentemente, la máxima pendiente de detección de la curva angular  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , se alcanzarán para aquellas multicapas en las que el valor de reflectancia en el ángulo de excitación del SPP sea mínimo; es decir, cuando  $R_{pp}(\theta_{spp}) \rightarrow 0$ . De ahí que la comparación de la sensibilidad  $\eta_{MOSPR}$  de dos estructuras MP distintas requiera que la resonancia esté optimizada. Como se vio en el apartado 2.2.2, este valor se alcanza cuando el espesor de la estructura MP es el denominado espesor de corte del MII excitado en la configuración de Kretschmann.

Para realizar este análisis teórico se recurre al MMT, el cual permite analizar las propiedades MP y la *sensibilidad* de la estructura indicada en la Figura 57. En concreto, gracias a un programa de cálculo desarrollado durante esta tesis en la plataforma de desarrollo MATLAB, se analizan la dependencia de estos parámetros

con los espesores  $d_{Co}$  y  $d_{Autop}$ <sup>20</sup> cuando  $d_{Aubottom}$  es aquel que optimiza la resonancia (que minimiza el valor de la reflectancia en  $\theta_{spp}$ ). Dependiendo de los valores de  $d_{Autop}$  y  $d_{Co}$ , dicho criterio se cumple para un espesor  $d_{Aubottom} = 0$  (estructuras de bicapas Au/Co) o para espesores  $d_{Aubottom} \neq 0$  (estructuras de tricapas Au/Co/Au). El valor del espesor  $d_{Aubottom}$  que optimiza la resonancia queda determinado a través del MMT. En todos los cálculos realizados en este apartado, se ha supuesto una longitud de onda incidente de  $660 \text{ nm}$ , un medio incidente con  $n_p = 1.516 \text{ RIU}$  y un medio externo con  $n_d = 1.3323 \text{ RIU}$ . Entre el medio incidente y la estructura MP se incluirá una capa de  $2 \text{ nm}$  de Ti, cuya absorción óptica es menor que la de la lámina de Cr empleada en el apartado anterior. Para  $\lambda = 660 \text{ nm}$  las constantes dieléctricas de los distintos materiales involucrados son:  $\epsilon_{xxAu} = -13,7 + 1,04 \cdot i$ ,  $\epsilon_{xxCo} = -12,12 + 19,75 \cdot i$  y  $\epsilon_{xxTi} = -4 + 13,55 \cdot i$ . Como constante MO para el Co se empleó  $\epsilon_{xzCo} = -0,470 + 0,0010 \cdot i$ . A la hora de determinar el parámetro  $\eta_{MOSPR}$  se supondrá un  $\delta n = 5 \cdot 10^{-4} \text{ RIU}$ .

Una vez calculada la combinación de espesores que satisface el criterio de reflectancia impuesto (ver Figura 58-a) y b), se analizan las propiedades MP de dicha combinación a través del estudio de las propiedades MO; es decir, del máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  (ver Figura 58-c)), y de la sensibilidad (ver Figura 58-d)) alcanzado para cada una de esas combinaciones de espesores. Como puede observarse, en el análisis teórico se limitan los espesores máximos de  $d_{Autop}$  y  $d_{Co}$  a  $40$  y  $20$  nanómetros, respectivamente. La Figura 58-c) muestra claramente que el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  se obtiene para las capas con un alto contenido en Co. En particular, para una capa puramente ferromagnética formada por  $20 \text{ nm}$  de Co. De acuerdo con los resultados previamente publicados [165], cuando se introduce Au en la multicapa, el efecto MO siempre es máximo cuando la capa ferromagnética se encuentra en contacto con el medio dieléctrico ( $d_{Autop} = 0$ ); es decir, cuando el campo electromagnético presente en la capa ferromagnética es máximo. Sin embargo, como cabría esperar, un gran aumento de los efectos MO no se traduce en una gran sensibilidad. Como muestra la Figura 58-d) la situación es bastante más compleja. La sensibilidad  $\eta_{MOSPR}$  muestra dos regiones de máximo valor, una en la región de las estructuras de bicapas ( $d_{Autop} \sim 40 \text{ nm}$  y  $d_{Co} \sim 12 \text{ nm}$ ) y la otra, en la región de las estructuras de tricapas ( $d_{Autop} \sim 25 \text{ nm}$ ,  $d_{Co} \sim 12 \text{ nm}$  y  $d_{Aubottom} \sim 10 \text{ nm}$ ).

<sup>20</sup> Es decir, la dependencia de las propiedades MP y de la sensibilidad con la cantidad y posición de la capa ferromagnética.

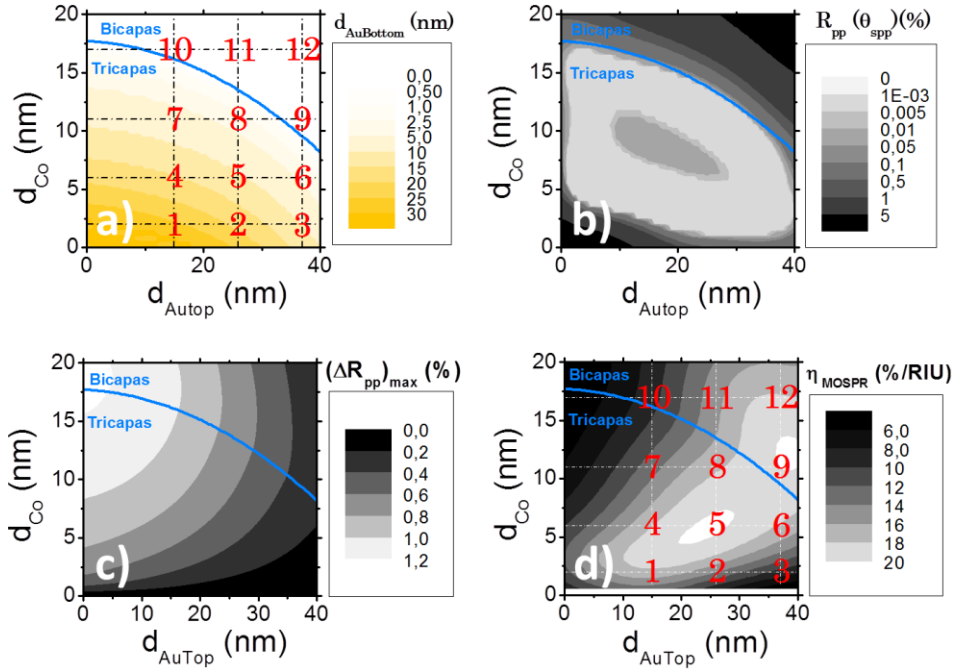


Figura 58 – Análisis teórico de la sensibilidad de un transductor MP Au/Co/Au. (a) Espesores óptimos teóricos de  $d_{AuBottom}$  para cada combinación de espesores  $[d_{AuTop}-d_{Co}]$ . Para cada combinación de espesores optimizada, se podrá determinar: (b) los valores mínimos de reflectancia alcanzados en el ángulo de excitación ( $R_{pp}(\theta_{spp})$ ), (c) el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  y (d) la sensibilidad del MOSPR de un transductor MP en función de  $d_{AuTop}$  y  $d_{Co}$ . En todos los mapas de contorno, la línea azul divide la región de bicapas (aquella en la que la estructura optimizada tiene un  $d_{AuBottom}=0$ ) de la región de tricapas (aquella en la que la estructura optimizada tiene un  $d_{AuBottom}\neq 0$ ). Finalmente, en la figura (d) las posiciones de los números rojos indican las combinaciones de espesores  $[d_{AuTop}-d_{Co}]$  experimentalmente evaluadas, mientras que el valor numérico se refiere a la combinación de espesores.

### 5.3.2.2. *Verificación experimental*

A la hora de corroborar experimentalmente este estudio teórico, se fabricaron 12 diferentes multicapas Au/Co/Au sobre un sustrato de vidrio BK7, siguiendo la misma estructura indicada en la Figura 57. Los espesores nominales de las 12 multicapas fabricadas, correspondientes a los 12 puntos indicados en las Figura 58-a) y d, son los indicados en Tabla 5.

**Tabla 5 – Parámetros experimentales (espesores nominales y valor de reflectancia alcanzado en la condición de resonancia) de los transductores MP fabricados.**

No.	$d_{AuTop}$ (nm) $\pm 0,3$ nm	$d_{Co}$ (nm) $\pm 0,3$ nm	$d_{AuBottom}$ (nm) $\pm 0,3$ nm	$R_{pp}$ ( $\theta = \theta_{spp}$ ) (%) $\pm 0,02$ %
1	15	2	26	0,24
2	26	2	18,5	0,50
3	37	2	10	0,55
4	15	6	15,5	0,06
5	26	6	10,5	0,14
6	37	6	4	0,87
7	15	11	6,5	0,09
8	26	11	3,5	0,17
9	37	11	0	3,11
10	15	17	0	1,20
11	26	17	0	1,52
12	37	17	0	4,22

Los transductores fueron fabricados en el interior de una cámara de ultra-alto vacío ( $P = 10^{-6}$  mbar y temperatura ambiente) mediante evaporación por haz de electrones. Debido a la fácil oxidación del Co en ambientes acuosos, se fijó un espesor mínimo de  $d_{Autop} = 15$  nm con el fin de proteger la capa de Co. La magnetización de la capa de Co se realiza mediante la aplicación de un campo magnético de  $\sim 50$  Oe y se invierte con una frecuencia de 64 Hz. La adquisición de la señal se llevó a cabo mediante un conversor I/V comercial y el procesamiento de la señal se realizó de manera software; es decir, mediante un análisis de Fourier de la señal. Los valores experimentales de  $\eta_{MOSPR}$  fueron determinados para un  $\delta n = 6 \cdot 10^{-4}$  RIU<sup>21</sup> mediante la monitorización en tiempo real del valor  $\Delta R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP.

<sup>21</sup>  $\delta n$  correspondiente a la diferencia de índice de refracción entre el agua desionizada y una dilución de EtOH al 1%.

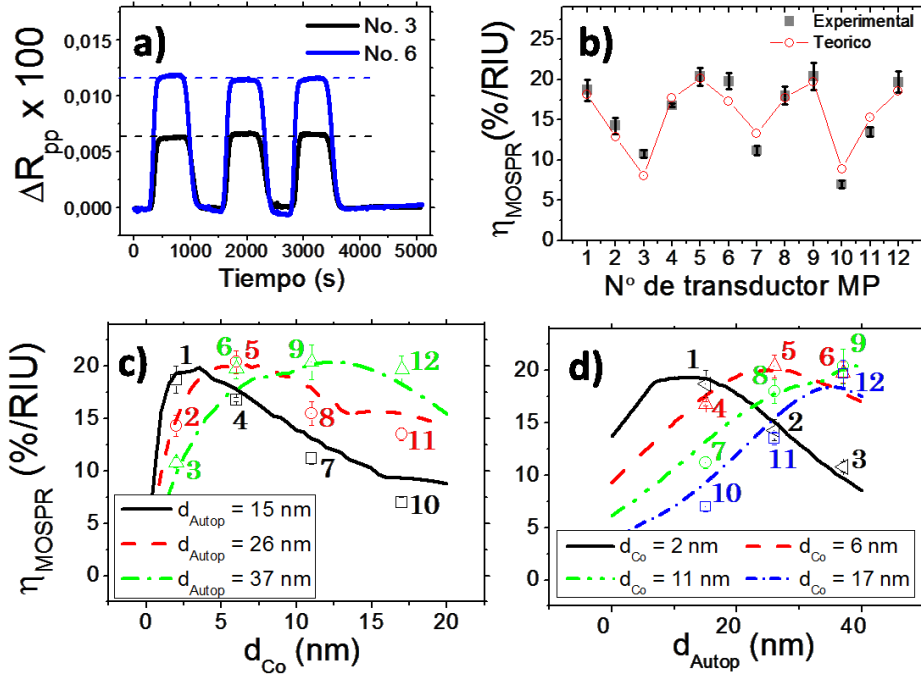


Figura 59 – Análisis experimental de la sensibilidad de un transductor MP Au/Co/Au. (a) Variación de  $\Delta R_{pp}(\theta = \theta_{spp})$  producida por un cambio de índice de refracción del medio externo  $\delta n_d = 6 \cdot 10^{-4}$  RIU para los transductores N° 3 y 6. (b) Valores teóricos y experimentales de la sensibilidad del MOSPR para las combinaciones de espesores indicadas en la Tabla 5. Finalmente, valores teóricos y experimentales de  $\eta_{MOSPR}$  para: (c) valores constantes de  $d_{Auto}$  y como función de  $d_{Co}$  y (d) viceversa.

El conjunto de gráficas de la Figura 59 muestra los resultados experimentales obtenidos. Como ejemplo de determinación experimental de la *sensibilidad*, la Figura 59-a) muestra (en el caso de los transductores N° 3 y 6) la variación temporal experimentada por  $\Delta R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP para tres cambios consecutivos de índice de refracción del medio externo. Los valores experimentales asignados a cada transductor se corresponderán con el valor promedio de las 3 variaciones  $\delta n$  generadas en cada uno de ellos (ver Figura 59-b)), y su error será la desviación estándar de dicho promedio. En la Figura 59-b) se puede observar cómo el valor de los resultados experimentales confirma los resultados teóricos previamente obtenidos. La Figura 59-c) y d) confirman además la tendencia observada en el mapa de contorno de la Figura 58-d). Según esto se deduce que:

- Las pequeñas diferencias observadas entre los valores teóricos y experimentales de  $\eta_{MOSPR}$  pueden ser atribuidas al error experimental en la determinación del espesor de las capas que constituyen la multicapa, así como a la rugosidad experimental que estas poseen y que no fue tomada en cuenta en los análisis teóricos.
- El hecho de que las multicapas con menor espesor de Au superior (N° 1, 4, 7 y 10) posean un valor experimental de  $\eta_{MOSPR}$  menor que el predicho por la teoría, es un indicativo de que probablemente la capa de Co

puede haberse visto afectada por el medio externo. A pesar de esto, los resultados experimentales confirman la existencia de dos regiones con máxima *sensibilidad*. La primera de ellas (multicapa N° 9) se corresponde con una estructura de bicapa con un lámina de Co de 11 nm de espesor, situada a 37 nm de la interfase metal/dieléctrico, y la otra a una estructura de tricapa (multicapa N° 5) con un espesor de Co de 6 nm situado a 26 nm de la interfase metal/dieléctrico.

- Se puede afirmar que el transductor MP más adecuado es aquel que presenta un buen equilibrio entre su actividad MO (alto contenido de material ferromagnético en las proximidades de la interfase metal/dieléctrico) y la anchura de su curva de resonancia (bajo contenido de material ferromagnético y lo más alejado posible de la interfase metal/dieléctrico).
- Según lo visto en la Figura 59-d), los transductores N° 5 y 9 poseen la misma *sensibilidad*  $\eta_{MOSPR}$ . Sin embargo, este parámetro no determina cuál de los dos transductores MP tendrá una mayor respuesta sensora<sup>22</sup>. En el caso de los transductores MP, ambos parámetros podrán ser relacionados a través del valor de reflectancia  $R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP; es decir, el valor de reflectancia alcanzado en el mínimo de la resonancia (indicado en la Tabla 5). Como se observa en la Figura 60, a igual sensibilidad, el transductor con menor valor de reflectancia en  $\theta_{spp}$ , generará un mayor incremento en  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , lo cual generará una mayor respuesta sensora.

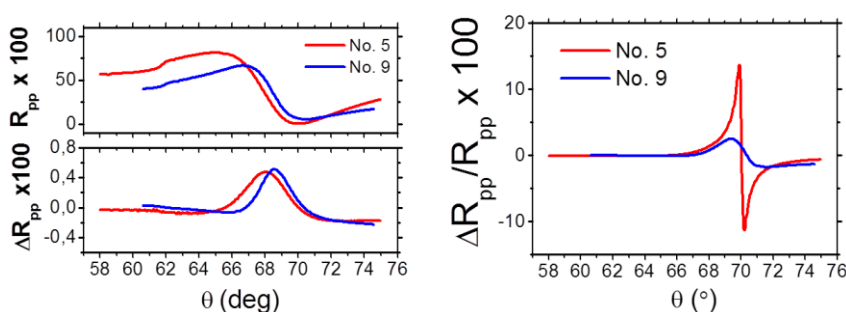


Figura 60 – Curvas experimentales de  $R_{pp}$ ,  $\Delta R_{pp}$  y de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  para los transductores N° 5 y 9.

### 5.3.3. Sensibilidad en función de la longitud de onda

Tras determinar el tipo de estructura y espesores que optimizan la respuesta sensora de un transductor MP, el siguiente paso será analizar dicha respuesta en función de la longitud de onda incidente, de forma similar a como se hizo en el caso del biosensor SPR (apartado 3.4). La única diferencia es que en este caso, en vez de emplear un

<sup>22</sup> Como ya se dijo, la *respuesta sensora* vendrá determinada por la *sensibilidad* y por el ruido del sistema.



parámetro de sensibilidad como el indicado por la ecuación ( 39 ), se empleará como parámetro de análisis la sensibilidad  $\eta_{MOSPR}$  definida anteriormente. De esta forma, bastará con repetir el cálculo teórico realizado en el apartado anterior, pero en este caso para diferentes longitudes de onda. Debido a la envergadura de este análisis, nuestro estudio se limita al rango visible del espectro electromagnético. En concreto, se analiza la sensibilidad  $\eta_{MOSPR}$  a 550, 600, 650, 700, 750 y 800 nm. Las constantes ópticas y MO empleadas en este cálculo son las indicadas en la Tabla 6. Para todas las longitudes de onda analizadas, el parámetro  $\eta_{MOSPR}$  fue calculado para un  $n_d = 1.3323$  RIU y un  $\delta n = 6 \cdot 10^{-4}$  RIU.

**Tabla 6 – Constantes ópticas y MO empleadas en la determinación de la sensibilidad del biosensor MOSPR en función de la longitud de onda.**

$\lambda$ [nm]	$\varepsilon_{xx}(Au)$	$\varepsilon_{xx}(Co)$	$\varepsilon_{xz}(Co)$	$\varepsilon_{xx}(Ti)$	$n(BK7)$ [RIU]
550	-5,936 +2,093 <i>i</i>	-4,798 +19,519 <i>i</i>	-0,449 -0,081 <i>i</i>	-3,244 +9,838 <i>i</i>	1,5183
600	-9,4265 +1,513 <i>i</i>	-4,957 +21,275 <i>i</i>	-0,554 -0,080 <i>i</i>	-3,698 +11,452 <i>i</i>	1,5162
650	-12,984 +1,111 <i>i</i>	-5,237 +23,274 <i>i</i>	-0,684 -0,065 <i>i</i>	-3,996 +11,173 <i>i</i>	1,5144
700	-16,504 +1,063 <i>i</i>	-5,567 +25,315 <i>i</i>	-0,819 -0,042 <i>i</i>	-4,070 +15,136 <i>i</i>	1,5130
750	-20,170 +1,248 <i>i</i>	-5,960 +27,340 <i>i</i>	-0,940 -0,006 <i>i</i>	-3,716 +17,150 <i>i</i>	1,5117
800	-20,170 +1,248 <i>i</i>	-5,960 +27,340 <i>i</i>	-0,940 -0,006 <i>i</i>	-3,716 +17,150 <i>i</i>	1,5107

Gracias al MMT y a los programas de cálculo desarrollados durante esta tesis doctoral, se ha podido:

- Determinar los espesores óptimos de  $d_{Aubottom}$  en función de la longitud de onda (ver Figura 61) para cada combinación de espesores  $d_{Autop} - d_{Co}$ .
- Una vez calculada (para cada longitud de onda) la combinación de espesores que optimiza la resonancia de la estructura MP, se puede determinar (para cada combinación de espesores óptimos) el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  alcanzado en función de la longitud de onda (ver Figura 62).

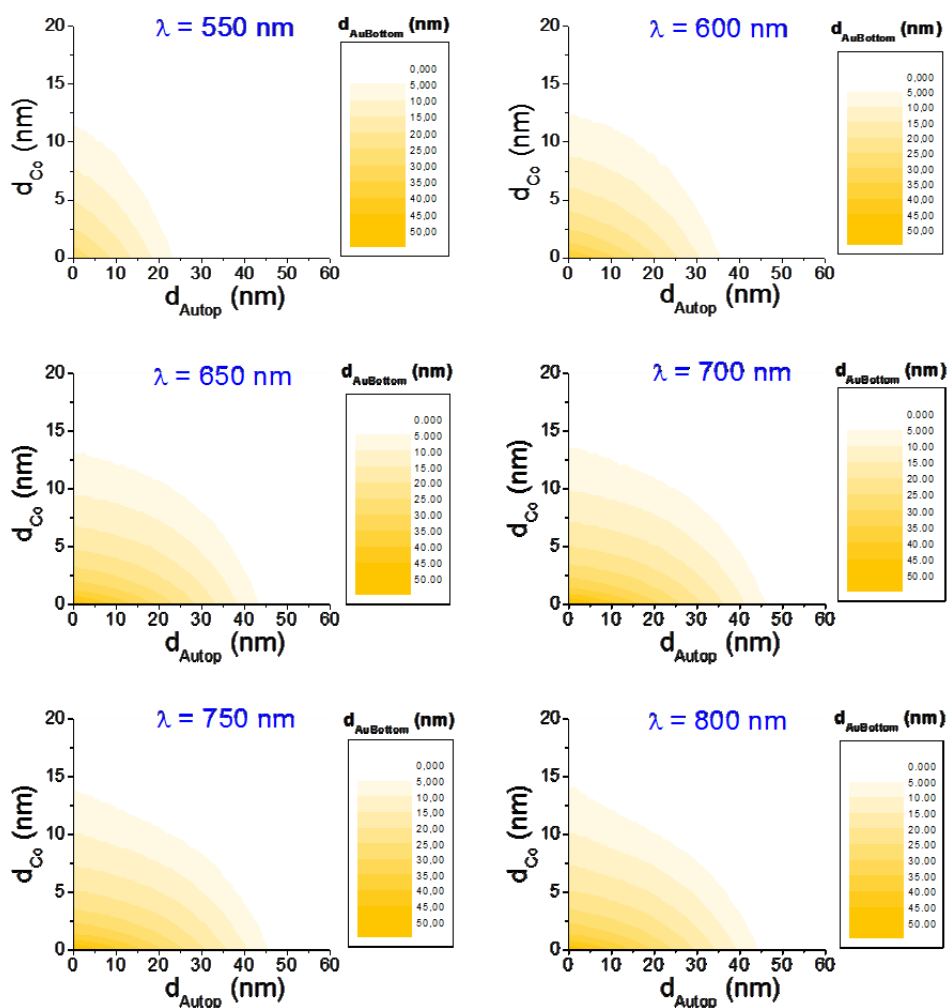


Figura 61 – Espesores óptimos teóricos de  $d_{AuBottom}$  para cada combinación de espesores  $[d_{AuTop}-d_{Co}]$  y para diferentes longitudes de onda.

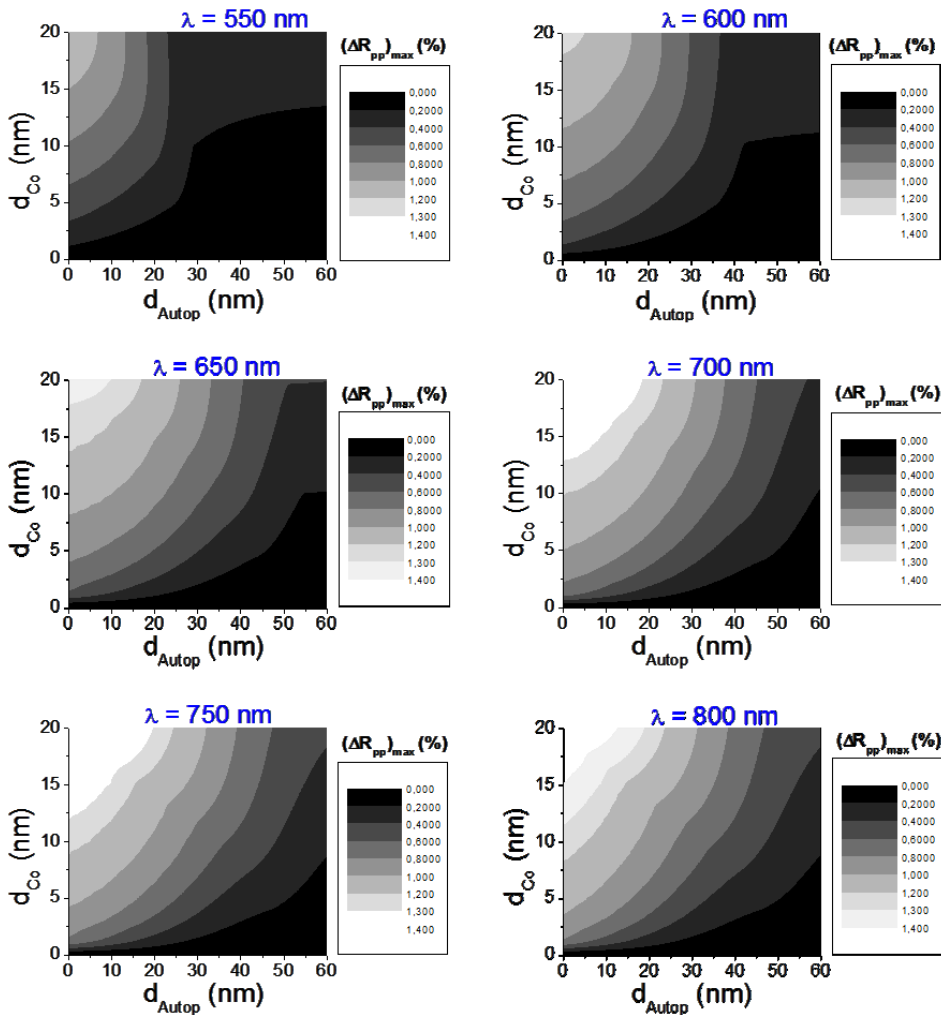


Figura 62 – Valor de  $\Delta R_{pp}$  de un transductor MP en función de la combinación  $d_{Auto}$ - $d_{Co}$  y de la longitud de onda incidente para cada combinación de espesores optimizada.

Finalmente, a la hora de poder determinar a qué longitud de onda y para qué espesores se maximiza la sensibilidad del biosensor MOSPR, se determinó el valor de  $\eta_{MOSPR}$  alcanzado por cada una de las combinaciones de espesores optimizados para las seis longitudes de onda analizadas (ver Figura 63).

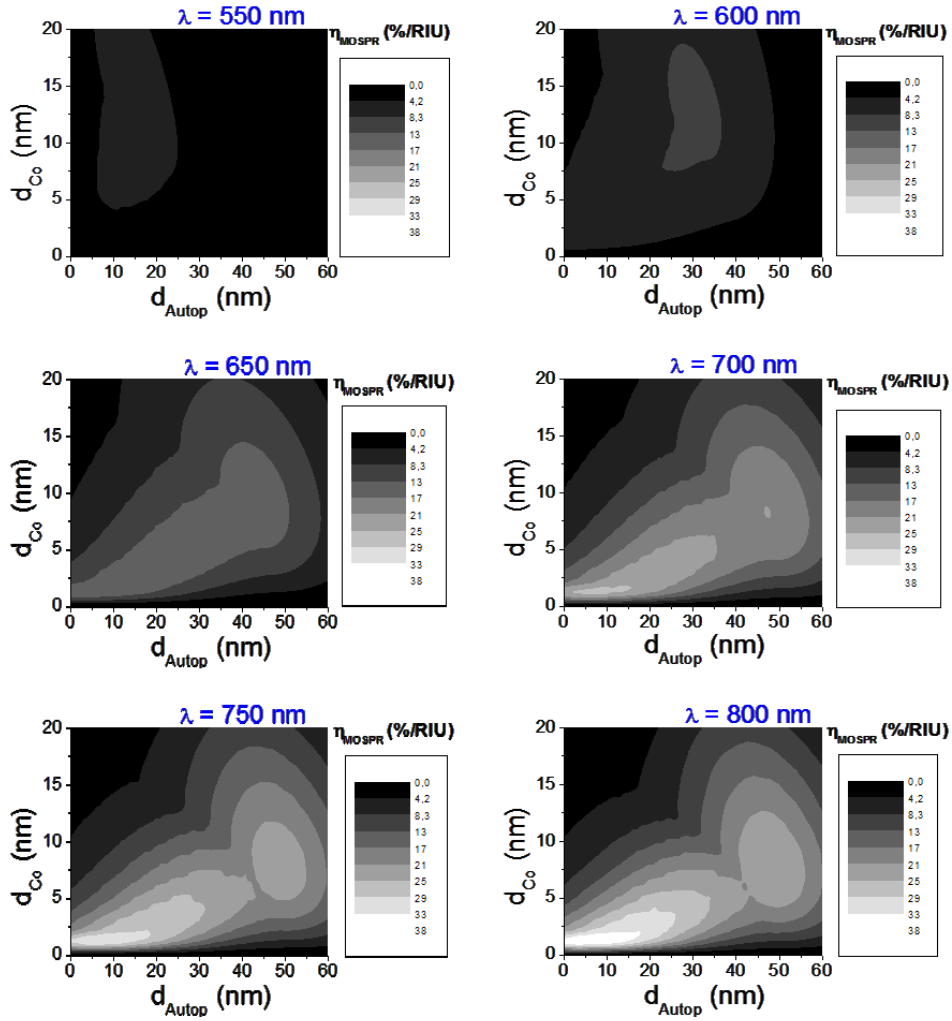


Figura 63 – Valor de la sensibilidad relativa del MOSPR de un transductor MP en función de la combinación  $d_{Autop}$ - $d_{Co}$  y de la longitud de onda incidente para cada combinación de espesores optimizada

De los resultados obtenidos, puede deducirse que:

- La actividad MO de las estructuras Au/Co/Au no varía mucho con la longitud de onda. El máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  alcanzado a partir de una  $\lambda > 600 \text{ nm}$  se encuentra entorno al 1.4 % de variación MO de la reflectancia. Independientemente de la longitud de onda incidente, para un valor constante de  $d_{Co}$ ,  $\Delta R_{pp}$  aumenta al disminuir el espesor de la capa superior de Au, mientras que si  $d_{Autop}$  permanece constante,  $\Delta R_{pp}$  aumenta al aumentar el espesor de la capa de Co.

- Sin embargo, la sensibilidad  $\eta_{MOSPR}$  aumenta claramente a medida que aumenta el valor de la longitud de onda empleada. Esto indica que el incremento de sensibilidad se debe fundamentalmente a la mejora de las propiedades plasmónicas (intensidad y anchura de la resonancia), experimentada por los transductores como consecuencia de la disminución de la absorción óptica del Au y el Co a altas longitud de onda, ya que como se comentó en el punto anterior, la actividad MO es prácticamente constante entre 600 y 800 nm.

A la hora de poder realizar una mejor interpretación de los resultados se hace necesario simplificar los mapas de contorno calculados. Así, la Figura 64-a) muestra la sensibilidad relativa de un transductor MP Au/Co/Au en función de la longitud de onda incidente, en el caso de que para cada longitud de onda la estructura MP empleada sea la que mejor sensibilidad presenta; es decir, se muestra el valor máximo de  $\eta_{MOSPR}$  para cada  $\lambda$ . Según esta figura:

- La sensibilidad de los transductores MP optimizados aumenta con la longitud de onda. Sin embargo, en el rango entre 650 – 800 nm los transductores MP con mayor sensibilidad presentan espesores  $d_{Autop}$  en torno a los 5 nm, lo cual hace que su aplicación práctica sea muy limitada debido a la falta de resistencia de estas estructuras de multicapas.
- La Figura 64-a) también muestra que, si se fijan unos valores razonables para los espesores  $d_{Autop} - d_{Co}$  (20 nm de Autop y 3 nm de Co), la sensibilidad del MOSPR sigue la misma tendencia, y tanto a altas como a bajas longitudes de onda apenas pierde un 10% de sensibilidad respecto a su valor máximo.

Resultaría también muy interesante saber, para esta última estructura, cuál sería el aumento de sensibilidad en función de  $\lambda$  experimentado por el sensor MOSPR con transductor Au/Co/Au, y comparar dicho valor con el calculado para el SPR en el apartado 3.4. La Figura 64-b) muestra el valor de los parámetros  $\eta_{MOSPR}$  y  $\eta_{SPR}^R$ . Dichos parámetros no pueden ser comparados en valor absoluto, ya que hacen referencia a distintas variaciones. Recordemos que (como muestra la Figura 64-c))  $\eta_{SPR}^R$  va asociado a la variación de la reflectancia  $p$ -polarizada, mientras que  $\eta_{MOSPR}$  se refiere a la variación de  $\Delta R_{pp}$ . De esta forma, aunque pueda parecer que tienen las mismas unidades, en realidad se refieren a cosas distintas. Sin embargo, si ambos parámetros son normalizados respecto a su valor máximo, será posible comparar la tendencia del aumento de sensibilidad experimentado en ambos sensores como consecuencia del aumento de la longitud de onda. Como se puede observar en la Figura 64-d), el incremento de sensibilidad experimentado como consecuencia del aumento de la longitud de onda incidente es prácticamente el mismo en ambos sensores.

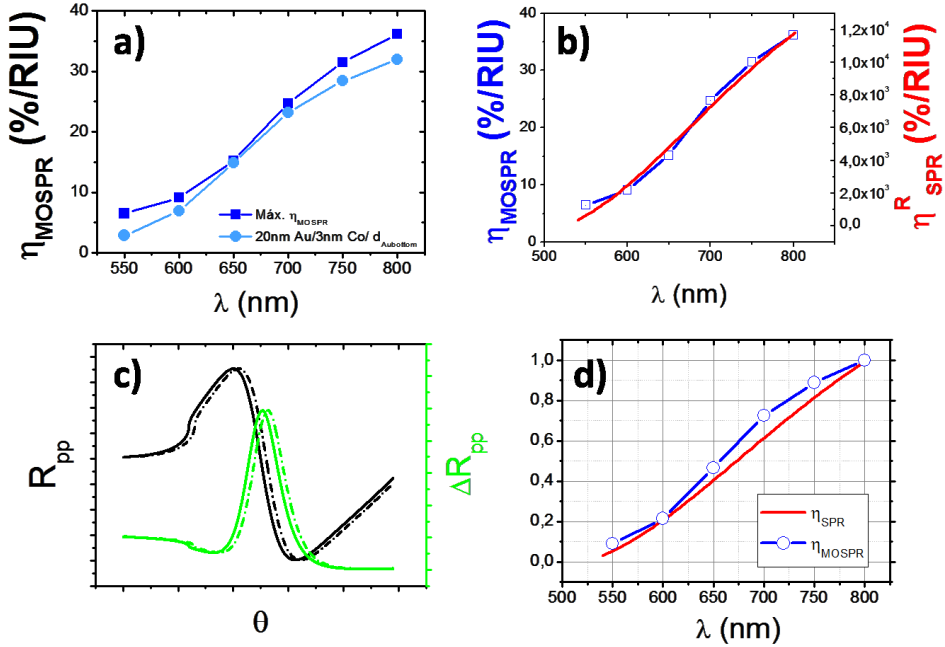
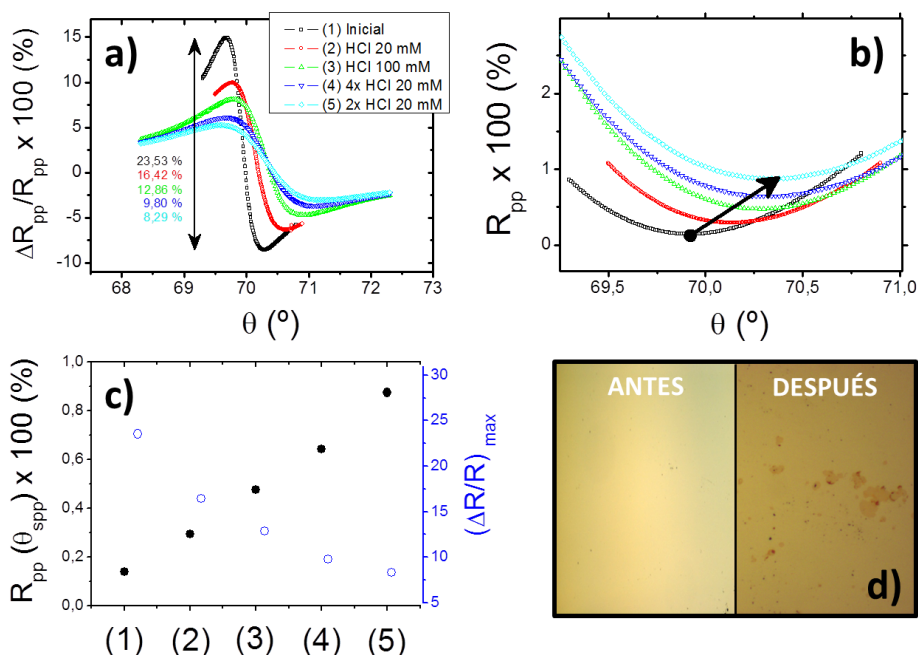


Figura 64 – (a) Sensibilidad en función de la longitud de onda para la estructura que posea el máximo  $\eta_{\text{MOSPR}}$  a cada  $\lambda$  [cuadrados] o para una estructura formada por 20nm Au/3 nm Co/ $d_{\text{Au bottom}}$  [círculos], siendo este último espesor el que optimiza la resonancia. (b) Respuesta espectral teórica de la sensibilidad del biosensor SPR y del MOSPR. (c) Variación de  $R_{\text{pp}}$  y de  $\Delta R_{\text{pp}}$  ante un cambio de índice de refracción del medio externo. (d) Sensibilidad normalizada en función de la longitud de onda incidente para el sensor SPR [línea roja] y para el sensor MOSPR [círculos azules].

#### 5.4. Caracterización experimental. Límite de detección

Una vez analizadas y optimizadas las propiedades de transductores MP formados por tricapas Au/Co/Au, resultaría muy interesante analizar la capacidad sensora de estas estructuras MP. La mejor forma de caracterizarlas es comparando experimentalmente la respuesta sensora del sensor MOSPR con este tipo de transductor MP y la de un sensor SPR convencional ante los mismos cambios de índice de refracción volumétricos del medio externo ( $n_d$ ). Sin embargo, antes de realizar dicha comparativa experimental, convendría realizar un estudio de resistencia de las estructuras Au/Co/Au. Por esto, se realizó un análisis de la resistencia de estas estructuras en función del espesor de la capa superior de Au. Para ello, se sometió al transductor al contacto (durante al menos 10 minutos) de disoluciones ácidas y básicas de diferentes concentraciones. De este estudio pudo concluirse que, estructuras Au/Co/Au con un espesor  $d_{\text{Autop}} < 15 \text{ nm}$  carecían de la estabilidad y resistencia necesarias para ser empleadas como transductores MP de un biosensor MOSPR. La Figura 65-a) muestra la disminución del efecto TMOKE sufrida por una estructura 12 nm Au<sub>top</sub>/7 nm Co/12 nm Au<sub>bottom</sub> cuando es atacada con

distintas disoluciones (de orden milimolar) de HCl <sup>23</sup>. Como muestran la Figura 65-b) y c), este incremento se debe principalmente al ensanchamiento de la curva de resonancia y al aumento de la reflectancia en el ángulo de excitación del SPP. La Figura 65-d) muestra una imagen de microscopía óptica de la superficie del transductor MP tras ser atacada.



**Figura 65 – Prueba de resistencia del transductor MP a disoluciones ácidas. Evolución de:** (a) la curva angular de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , (b) de la reflectancia en el ángulo de excitación, (c) el valor de  $R_{pp}(\theta_{spp})$  y  $(\Delta R/R)_{max}$  de una estructura formada por 12nm  $Au_{top}$ /7nm  $Co$ /12nm  $Au_{bottom}$ . Finalmente, (d) muestra una imagen de microscopio del deterioro experimentado por la superficie del transductor tras ser atacada por las disoluciones de HCl.

Finalmente, tras el estudio de resistencia, se realizó una comparación directa entre la respuesta sensora del biosensor MOSPR (con la estructura N°5 del apartado 5.3.2 como transductor MP) y la respuesta sensora del mismo sistema experimental actuando como biosensor SPR (con una lámina de 48 nm Au como transductor plasmónico). Los resultados experimentales (ver Figura 66) muestran una respuesta sensora 3,3 veces mayor en el caso del biosensor MOSPR. El sistema y condiciones experimentales empleadas en esta comparativa son las indicadas en el apartado 5.3.2 de esta memoria. En esta ocasión, el ruido del sistema se definió como la desviación cuadrática media de la señal experimental adquirida durante 500 s a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, cuando el medio externo  $n_d$  permanece invariante. El cambio de índice de refracción del medio externo fue realizado mediante la inyección de una dilución acuosa de etanol al  $10^{-2}$  %.

<sup>23</sup> Disoluciones de este tipo son usualmente empleas como agente regenerador de la superficie en los protocolos de medida.

Con los resultados obtenidos, se puede estimar que el  $LOD^{24}$  del biosensor MOSPR desarrollado es tres veces mayor que el del mismo sistema experimental actuando como biosensor SPR (  $LOD_{MOSPR} = 9 \cdot 10^{-6} RIU$  y  $LOD_{SPR} = 3 \cdot 10^{-5} RIU$ ). La sensibilidad (y por lo tanto, el LOD) de ambos sensores puede aumentarse si se emplea una longitud de onda incidente mayor o si se disminuye el ruido experimental del sistema. Según los cálculos realizados (ver Figura 64-d)), aumentando la  $\lambda$  hasta  $800 \text{ nm}$  se duplicaría la sensibilidad de ambos dispositivos.

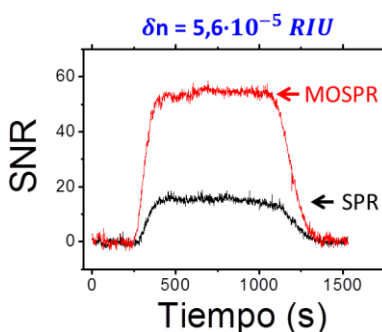


Figura 66 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR y del SPR ante un mismo cambio de índice de refracción volumétrico  $\delta n = 5,6 \cdot 10^{-5} RIU$ .

## 5.5. Optimización del sistema experimental

Los datos obtenidos durante el análisis y optimización de la sensibilidad del biosensor MOSPR permitieron simplificar y optimizar el sistema experimental de medida. Se decidió desechar el láser con longitud de onda más baja, mejorar la óptica del diodo láser y el sistema de flujo. También optamos por realizar un procesamiento híbrido de la señal (hardware/software) a fin de simplificar al máximo el sistema. El resto de elementos empleados son los mismos que en el sistema inicialmente desarrollado. De esta forma, el sistema experimental final (el empleado en la caracterización y la comparativa biosensora) es el presentado en la Figura 67, cuyos elementos se describen en la Tabla 7.

Tabla 7 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 67.

No.	ELEMENTO	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
1	Posicionar del láser	Sistema YZ	Formado por dos plataformas de desplazamiento colocadas a $90^\circ$ (2x PT1/M I <sup>1</sup> ).

<sup>24</sup> Definido como el  $\delta n$  que proporciona una variación de señal 3 veces mayor que ruido experimental del sistema (el valor de incertidumbre admitido).



2	Diodo láser (660 nm)	ML101J27 <sup>I</sup>	Un sistema LTC100-B <sup>II</sup> nos permite controlar y estabilizar en temperatura el diodo láser.
3	Óptica del láser	A414TM-B <sup>II</sup> CXY1 <sup>II</sup>	Para colimar el haz se utilizó una lente con f=3 mm.  Nos permite posicionar la lente en el plano perpendicular al eje óptico.
4	Espejo	PF10-03-P01 <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma cinemática (KCB1 <sup>II</sup> ).
5	Polarizador	GTH10M <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma rotatoria que permite ajustar el eje de polarización (CRM1L/M <sup>II</sup> ).
6	Diafragma	SM1D12 <sup>II</sup>	En este punto del sistema pueden colocarse diferentes filtros ópticos para adecuar la potencia del haz incidente.
7	Sistema de medida angular de reflectancia	-	El mismo descrito en el apartado 5.2.7. Elementos 7-12 y 14.
8	Bomba de flujo	NE300 <sup>III</sup>	Bomba de jeringa de flujo continuo.

<sup>I</sup> Mitsubishi Electric – <http://www.mitsubishielectric-mesh.com/products/pdf/ml1xx27.pdf>

<sup>II</sup> Thorlabs – <http://www.thorlabs.de/>

<sup>III</sup> New Era Pump Systems – <http://www.syringepump.com/>

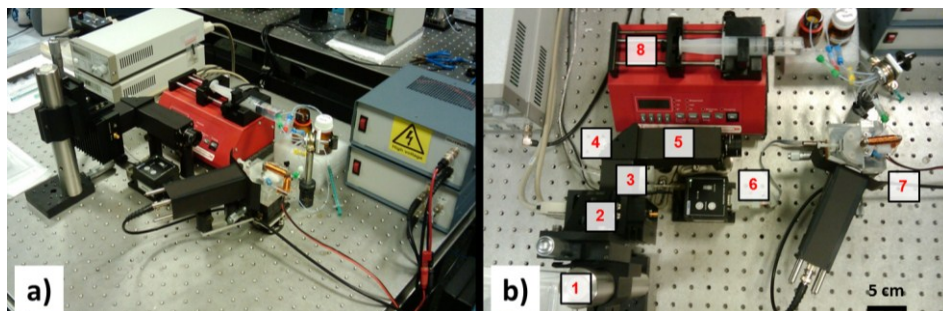


Figura 67 – Sistema experimental MOSPR empleado en los apartados 5.4 y 5.5 de esta memoria de tesis doctoral. (a) Vista general del sistema y (b) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 7

## 5.6. Comparativa biosensora. MOSPR vs. SPR

El objetivo final de este capítulo es comparar la respuesta biosensora del dispositivo MOSPR optimizado con la del biosensor SPR de intensidad. Para ello se eligió como prueba de concepto, la detección directa de la hibridación de cadenas cortas de ADN. Se eligió este sistema ya que, debido a su bajo peso molecular, la detección de cadenas cortas de ADN supone un reto para el biosensor SPR. Previamente se ha demostrado que, de los transductores MP fabricados en esta tesis, la mayor respuesta sensora corresponde a la tricapa Au/Co/Au con los espesores del transductor  $N^{\circ}$  5 indicados en la Tabla 5. Dicha combinación de espesores ha de ser comparada con el transductor plasmónico con mejor sensibilidad, que en el caso de emplear un haz incidente de  $660\text{ nm}$ , estará formado por una estructura de  $48\text{ nm Au}/2\text{ nm Ti}$ . Ambos transductores fueron fabricados sobre el mismo tipo de sustrato (vidrio Bk7), y bajo las mismas condiciones. En la Figura 68 se puede observar las curvas angulares de resonancia de ambos transductores y la curva angular de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  en el caso del transductor MP.

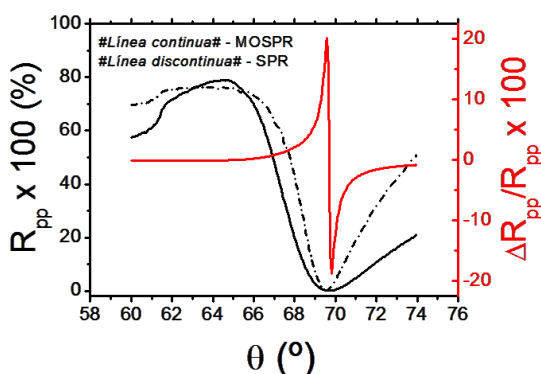


Figura 68 – Curvas angulares de detección para el transductor plasmónico y el transductor MP.

Debido a la diferente naturaleza de las medidas, la comparativa sensora debe realizarse teniendo en cuenta la SNR de ambos sensores, siendo definido el ruido del sistema como la desviación cuadrática media de la señal adquirida durante 1000 s con una frecuencia de muestreo de  $1\text{ Hz}$  y cuando  $n_d$  permanece constante. Así mismo, la evaluación de la respuesta sensora de ambos dispositivos debe realizarse, estrictamente, bajo las mismas condiciones experimentales; es decir, empleando el mismo sistema experimental y condiciones en el bioensayo. El valor de  $\sigma_i$  determinado para cada sensor fue de  $\sigma_i(\text{MOSPR}) = 0,028$  y de  $\sigma_i(\text{SPR}) = 0,013$ .

Para mejorar la resistencia de las multicapas MP en soluciones con un pH bajo o con alta fuerza iónica, se ha empleado y desarrollado un protocolo de inmovilización auto-ensamblado basado en multicapas de polielectrolitos<sup>25</sup> (ver

<sup>25</sup> Polímero que posee grupos electrolíticos y por lo tanto, posee una carga eléctrica neta.

Figura 69). Este protocolo (cuyos detalles pueden encontrarse en Tabla 8) permite obtener una superficie final con una distribución superficial uniforme de biotinas, ideal para la biofuncionalización de esta superficie con estreptavidinas y la posterior inmovilización de ADN-biotinilado sobre la superficie del transductor. Este protocolo, además de proporcionar una distribución espacial controlada de bioreceptores (ADN-biotinilado) muy conveniente cuando se trabaja con ADN, genera una delgada capa protectora de polímero ( $\sim 3\text{ nm}$ ) y minimiza las absorciones inespecíficas gracias al polietilenglicol.

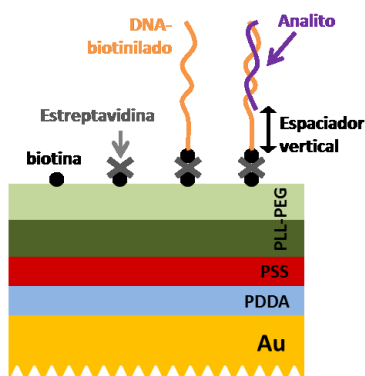


Figura 69 – Vista esquemática del protocolo de inmovilización de ADN empleado en este apartado.

Tabla 8 – Protocolo de inmovilización e hibridación empleado.

Nº	Etap	Condiciones
1.	Multicapa de polielectrolitos	<p>1.1 - Se inyectan 300 <math>\mu\text{l}</math> de una disolución acuosa de PDDA<sup>+</sup> al 2% en peso.</p> <p>1.2 - Se inyectan 300 <math>\mu\text{l}</math> de una disolución acuosa de PSS<sup>+</sup> al 2% en peso.</p> <p>1.3 - Se inyectan 300 <math>\mu\text{l}</math> de una disolución acuosa de 0,5 mg/ml de PLL-PEG<sup>#</sup> biotinilado.</p>
2.	Inmovilización de estreptavidina (SA)	Se inyectan 10 $\mu\text{g/ml}$ de SA preparados en un volumen de 300 $\mu\text{l}$ de <i>buffer</i> PBS <sup>++</sup> .
3.	Inmovilización de ADN-biotinilado	Se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de una disolución 1 $\mu\text{M}$ de una secuencia de ADN-biotinilado de 26 bases ( $M_w = 8278,22\text{ g/mol}$ ) en <i>buffer</i> PB <sup>++</sup> . De las 26 bases inmovilizadas sólo 11 estarán implicadas en la detección. Las otras 15 se usan como espaciador vertical.

4. Hibridación de ADN (analito) La hibridación de la secuencia complementaria ( $M_w = 3363,25 \text{ g/mol}$ ) se realiza a temperatura ambiente. Se inyectan  $300 \mu\text{l}$  de una disolución  $1 \mu\text{M}$  de la secuencia a detectar (analito) en un *buffer* de SSC<sup>##</sup>.

\* PDDA – *poly(diallyldimethylammonium chloride)*.

+ PSS – *poly(sodium 4-styrenesulfonate)*.

# PLL-PEG-b)iotinilado – *poly-L-lysine grafted with a biotinylated poly(ethylene glycol)*.

\*\* Buffer PBS – 10mM phosphate pH 7,4 with 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl.

++ Buffer PB – 50mM phosphate buffered (PB) solution with 0,5 M NaCl, pH 7.

## Buffer SSC – 0,075 M sodium citrate (SSC) with 0,75 M NaCl, at neutral pH.

*Nota:* La velocidad de flujo empleada en todos los procesos fue de  $v = 20 \mu\text{l/min}$ .

La Figura 70-a) y b) muestra, para ambos sensores, la respuesta a la inmovilización superficial de estreptavidina y el ADN-biotinilado, mientras que la Figura 70-c) muestra la respuesta de hibridación de un analito formada por únicamente 11 bases totalmente complementarias. En estas figuras se observa cómo, la respuesta del MOSPR es aproximadamente cuatro veces mayor que la del biosensor SPR, incluso para la detección del analito de bajo peso molecular, permitiendo una clara detección de la misma en comparación con la débil señal proporcionada por el biosensor SPR.

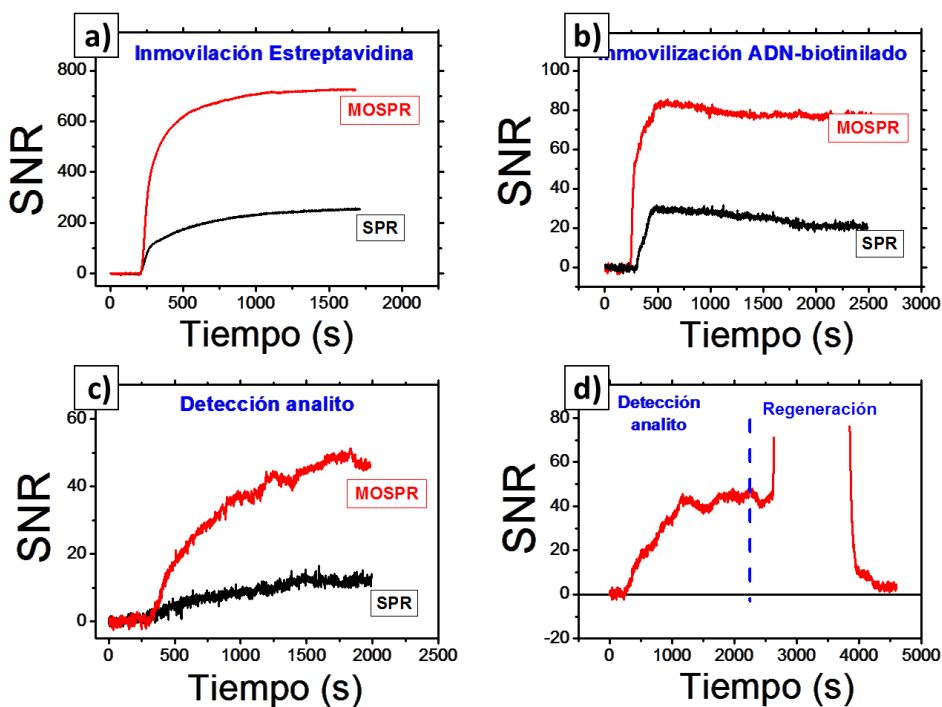
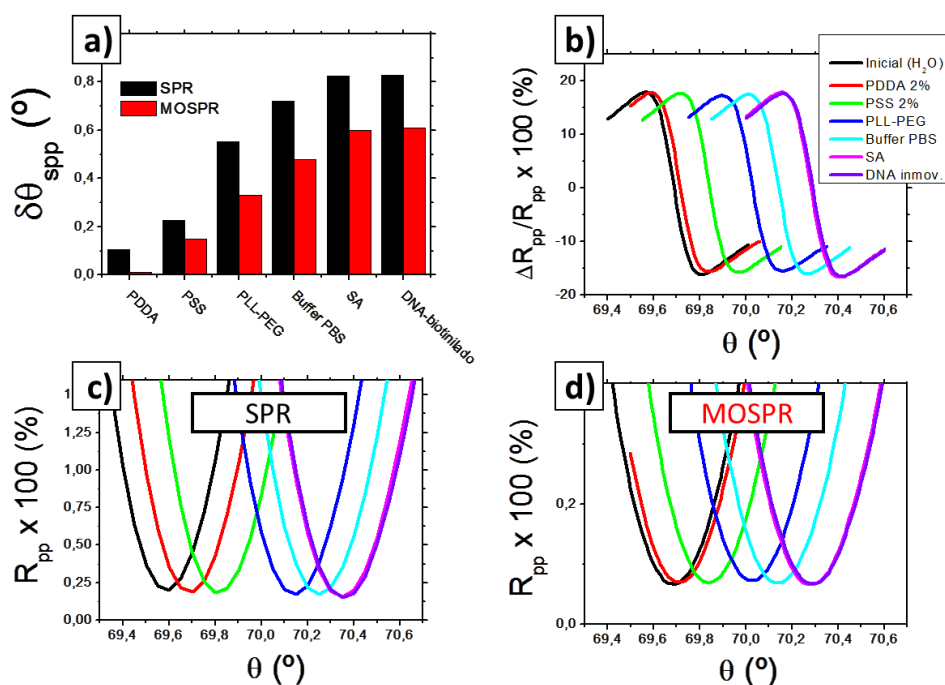


Figura 70 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR y el SPR al protocolo indicado en la Tabla 8.

Además del claro aumento de sensibilidad observado y de la capacidad del sensor MOSPR de detectar analitos de bajo peso molecular, la Figura 70-d) demuestra que, gracias a la utilización de este novedoso método de inmovilización, resulta posible regenerar la superficie del transductor MP mediante el uso de una solución de formamida al 35 %, permitiendo al menos 10 ciclos de hibridación-regeneración sobre el mismo transductor MP.

Con esta comparativa, además de determinar la respuesta sensora del MOSPR, también se ha podido analizar el desplazamiento angular experimentado por las curvas angulares de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  y  $R_{pp}$ , obteniendo valiosa información sobre la dependencia con el índice de refracción del medio externo del  $k_{spp}$  de las estructuras MP.



**Figura 71 – Desplazamiento angular experimentado por el biosensor MOSPR y el SPR durante el proceso de inmovilización llevado a cabo. (a) Desplazamiento acumulado desde la curva inicial, (b) Curvas angulares de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , (c) curvas angulares de  $R_{pp}$  del biosensor SPR y (d) del biosensor MOSPR.**

Los resultados de este análisis, mostrados en la Figura 71, revelan que (en promedio) los desplazamientos angulares de la curva  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  del transductor MP son un 33 % más pequeños que los del transductor plasmónico. Esta menor dependencia del  $k_{spp}$  de la estructura MP, debida a la mayor absorción óptica que esta posee respecto al transductor plasmónico, no impide que la sensibilidad alcanzada por el sensor MOSPR sea notablemente superior que la del sensor SPR.

Finalmente, de las simulaciones y resultados obtenidos puede concluirse que la respuesta sensora del biosensor MOSPR estará caracterizada por el producto de dos parámetros (la derivada angular de  $\Delta R_{pp}$  y la dependencia del ángulo de excitación del SPP con el medio externo). Es decir:

$$\eta_{MOSPR}(\lambda) = \frac{\delta \Delta R_{pp}(\lambda)}{\delta n} = \frac{\partial \Delta R_{pp}}{\partial \theta} \cdot \frac{\partial \theta_{spp}}{\partial n} \quad (57)$$

donde  $\partial \Delta R_{pp} / \partial \theta$  es función de la actividad MO y de las características plasmónicas del transductor (intensidad y anchura de la resonancia), mientras que  $\partial \theta_{spp} / \partial n$  estará determinada por la dependencia del  $k_{spp}$  de la estructura MP a los cambios de índice de refracción del medio externo, la cual a su vez está controlada por la propiedades ópticas de la estructura. Como se ha demostrado, la posición y espesor de la capa ferromagnética permite optimizar ambos parámetros y diseñar transductores MP con un mayor capacidad sensora que los puramente plasmónicos empleados en el sensor SPR convencional.

## 5.7. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha demostrado que:

- La combinación de metales nobles y ferromagnéticos proporciona estructuras magneto-plasmónicas con extraordinarias propiedades MP, pudiendo además emplear estas estructuras como transductores del biosensor MOSPR.
- La actividad magneto-óptica de las estructuras formadas por Au/Co es mucho mayor que la de las estructuras Au/Fe, mientras que la estabilidad de los transductores formados por Au/Fe es mejor que la de los formados por Au/Co.
- Las estructuras MP en forma de tricap, metal noble/metal ferromagnético/metal noble, resultan ideales para ser empleadas como transductor MP, ya que los espesores de la capa superior de metal noble y la ferromagnética permiten controlar las propiedades magneto-ópticas de la estructura, mientras que la capa inferior de metal noble permite ajustar la resonancia y optimizar la reflectancia en el ángulo de excitación del plasmón (es decir, la transferencia de energía).

El análisis teórico/experimental de la sensibilidad de estructuras de multicapas Au/Co ha puesto de manifiesto la gran y compleja influencia que tiene el espesor y la posición de la capa ferromagnética en la respuesta sensora de la multicapa. En concreto, se ha verificado que:

- Contrariamente a lo que cabría esperar, la sensibilidad de los transductores MP no se maximiza con su actividad magneto-óptica ni con su respuesta plasmónica (dependencia del vector de ondas del SPP con el medio externo). El estudio revela que los transductores magneto-plasmónicos han de alcanzar un equilibrio entre ambas propiedades. Es en esa situación cuando la respuesta sensora de las multicapas se verá maximizada.
- La respuesta sensora de estructuras de multicapas Au/Co aumenta a medida que lo hace la longitud de onda, al menos en la región visible del espectro electromagnético, y que dicho incremento es equivalente al experimentado por la sensibilidad de un biosensor SPR de intensidad.

Finalmente, el empleo de una estructura Au/Co/Au, cuyas propiedades magneto-plasmónicas fueron optimizadas mediante el método de diseño desarrollado, permitió verificar de forma experimental la mayor capacidad sensora del biosensor MOSPR frente al biosensor SPR. En concreto, se obtuvo que:

- El límite de detección del biosensor MOSPR, en el caso de variaciones volumétricas del índice de refracción del medio externo, es unas tres veces más pequeño que el alcanzado por un biosensor SPR con iguales características. Para el sistema experimental desarrollado y con una  $\lambda = 660 \text{ nm}$  se ha establecido un  $LOD_{MOSPR} = 9 \cdot 10^{-6} \text{ RIU}$ .
- La comparativa biosensora entre ambos dispositivos demuestra la capacidad del biosensor MOSPR para determinar analitos de bajo peso molecular, y como la respuesta sensora del biosensor MOSPR a los cambios de índice de refracción superficiales es cuatro veces mayor que la del biosensor SPR. Ante los cambios de índice de refracción volumétricos, el incremento de la respuesta sensora obtenido ( $\sim 3,3$  veces) es ligeramente inferior al caso superficial. Esto se debe a que, la distancia de penetración en el dieléctrico del transductor MP es menor que la del transductor plasmónico de Au y que, por lo tanto, el transductor MP concentra aún más su sensibilidad sobre la superficie del metal.

El aumento de la longitud de onda incidente permitiría disminuir los LOD alcanzados para ambos sensores, pero (tal como se ha demostrado) mantendría constante el incremento de sensibilidad obtenido para el sensor MOSPR respecto al sensor SPR. En concreto, empleando una longitud de onda próxima a los  $800 \text{ nm}$ , ambos sensores duplicarían su sensibilidad. El factor de incremento de sensibilidad alcanzado con el sistema experimental desarrollado no representa en absoluto el máximo aumento de la respuesta sensora alcanzable en el sensor MOSPR respecto al SPR. Este podría mejorarse con la disminución del ruido experimental del sistema; por ejemplo, a través del aumento de la frecuencia de modulación del sistema o de la optimización del análisis electrónico de las señales. También podría mejorarse la sensibilidad del MOSPR mediante el desarrollo de nuevos materiales magneto-plasmónicos (a aleaciones) con mejores propiedades magneto-plasmónicas, o a través de la optimización experimental (condiciones de crecimiento) de los materiales existentes.





# Capítulo 6

## BIOSENSOR $\lambda$ MSPR

*“Muchos fracasos de la vida han sido de hombres que no supieron darse cuenta de lo cerca que estaban del éxito cuando se rindieron”*

THOMAS ALVA EDISON

---

Tras demostrar que la respuesta de los transductores MP depende la derivada angular de  $\Delta R_{pp}$  y la dependencia del ángulo de excitación del SPP con el medio externo, y que ha de alcanzarse un equilibrio entre ambos parámetros para maximizar la respuesta sensora del MOSPR; resulta inevitable plantearse si sería posible modular el SPP de un transductor puramente plasmónico mediante alguna técnica que, generando a la vez estrechas e intensas curvas angulares de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , mantuviese todas la propiedades de los  $k_{spp}$  de este tipo de transductores (distancia de propagación y penetración, dependencia con el medio externo...). Sin duda, esto posibilitaría el desarrollo de biosensores plasmónicos con una respuesta sensora mayor que la mostrada por el biosensor MOSPR, y por lo tanto, mucho mayor que la del biosensor SPR.

El concepto de **modulación en longitud de onda del SPP**, desarrollado por vez primera durante esta tesis doctoral, surge de la fuerte dependencia con la longitud de onda de la constante dieléctrica de los materiales plasmónicos, como por ejemplo, el Au o la Ag. Gracias a esta dependencia resulta posible modular el SPP de forma externa, ya que al modificar la longitud de onda incidente, se modifica el valor de la constante dieléctrica del metal por el que se propaga el SPP, modificando a su vez el valor de  $k_{spp}$  y consecuentemente, la condición de excitación del SPP. En el presente capítulo no sólo se analiza esta novedosa técnica de modulación, sino que también se estudia la posibilidad de desarrollar un dispositivo SPR-modulado, el cual hemos denotado como biosensor  $\lambda$ MSPR (del inglés, *Lambda Modulation Surface Plasmon Resonance*).

## 6.1. Modulación en longitud de onda del plasmón superficial

La modulación MO del SPP es una técnica de modulación que se puede considerar como intrínseca; es decir, se produce por una modificación directa e interna de las propiedades ópticas del metal que forma la interfase por la que se propaga el SPP. Esta técnica no es la única técnica intrínseca capaz de modificar el SPP (se podrían emplear otras técnicas basadas en: los efectos electro-ópticos, termo-ópticos, acusto-ópticos, etc.). Sin embargo, a día de hoy, la modulación MO del SPP es la única que se ha empleado en el desarrollo de dispositivos biosensores plasmónicos.

Existen otros tipos de técnicas de modulación plasmónica, consideradas extrínsecas, las cuales también generan curvas de variación relativa o normalizada de algún parámetro asociado al SPP (intensidad, fase, polarización, etc.). A diferencia de las técnicas intrínsecas, en las extrínsecas no se realiza una modificación directa de las constantes ópticas del metal, si no que la modulación del SPP se realiza de una forma externa. Hasta ahora se han desarrollado principalmente dispositivos modulados mecánicamente o modulados en fase.

- En los primeros, se varía de forma mecánica el ángulo de incidencia entre dos valores próximos, generándose de forma cuasi-simultánea dos curvas angulares de resonancia (una para cada ángulo de incidencia), y por lo tanto, produciéndose una situación análoga a la indicada en la Figura 36-b) y c).
- Los segundos, más costosos y complejos, hacen uso del brusco cambio de fase que se produce justo en el ángulo de excitación del SPP. De esta forma, en los SPR modulados en fase se determina la variación relativa de la fase de un haz de luz *p*-polarizado respecto a un haz *s*-polarizado, el cual (al no poder excitar el SPP) no sufrirá ningún cambio de fase.

Los resultados obtenidos hasta ahora con las técnicas extrínsecas son muy diversos. Por un lado, los dispositivos modulados mecánicamente han demostrado ser capaces de actuar como dispositivos sensores, pero no se ha realizado ninguna comparación directa entre estos y los SPR convencionales que permita cuantificar el aumento de sensibilidad que se presupone. Los modulados en fase son mucho más numerosos que los mecánicos, existiendo una gran variedad de configuraciones y subtipos de sensores. Sin embargo, existe cierta controversia respecto a su superior capacidad sensora [166,167].

Dentro de las técnicas de modulación plasmónicas consideradas como extrínsecas, existe una posibilidad (nunca antes investigada) que consiste en hacer uso de la dependencia espectral de las constantes dieléctricas de los metales; es decir, de la variación de la constante dieléctrica de los metales con la longitud de onda de la luz incidente (ver Apéndice A). Así, suponiendo por simplicidad una única interfase metal/dieléctrico formada por medios semi-infinitos, se tendrá que:

$$k_{spp}(\lambda) = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m(\lambda) \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_d + \varepsilon_m(\lambda)}} \quad (58)$$

Y consecuentemente, la condición de excitación de la configuración de Kretschmann será:

$$\Rightarrow k_{spp}(\lambda_0 \pm \Delta\lambda) \equiv k_{\parallel}^{luz} = k_0 \cdot \sqrt{\varepsilon_p} \cdot \sin(\theta_{spp}(\lambda_0 \pm \Delta\lambda)) \quad (59)$$

$$\Rightarrow k_{spp}(\lambda_0 \pm \Delta\lambda) \equiv k_{\parallel}^{luz} = k_0 \cdot \sqrt{\varepsilon_p} \cdot \sin\left(\theta_{spp}(\lambda_0) \pm \frac{\Delta\theta_{\lambda}(\Delta\lambda)}{2}\right) \quad (60)$$

Por lo tanto, al incidir con un haz monocromático cuya longitud de onda  $\lambda$  es modulado una cantidad  $\Delta\lambda \ll \lambda$ , se produce una situación totalmente análoga a la de la modulación magneto-óptica (ver Figura 72).

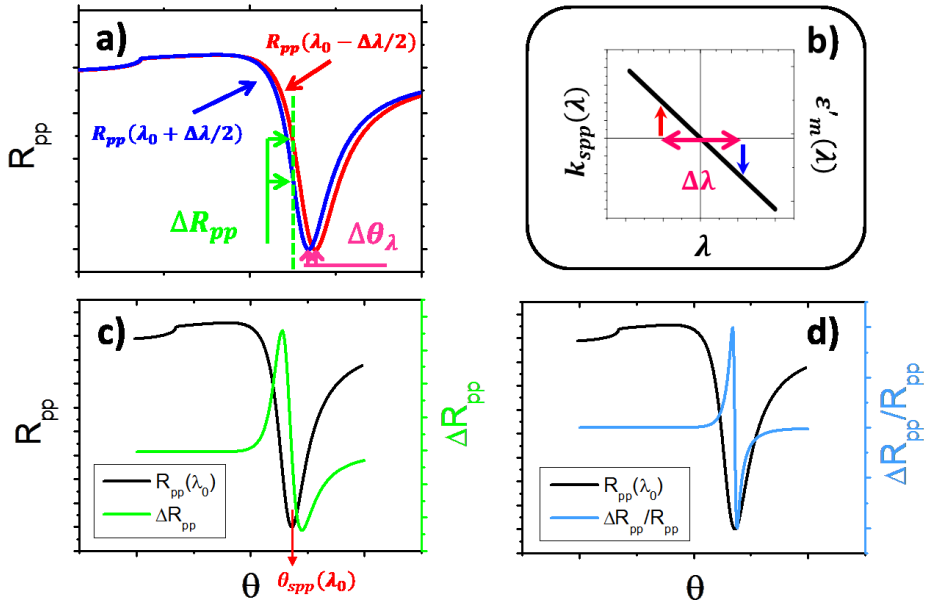


Figura 72 – Modulación en longitud de onda del SPP en configuración de Kretschmann. (a) Curva angular de reflectancia, (b) dependencia en  $\lambda$  de la constante dieléctrica del metal y del vector de ondas del SPP. En (c) curvas angulares de reflectancia y variación en  $\lambda$  de reflectancia, y (d) reflectancia y variación relativa de reflectancia.

Esta novedosa técnica de modulación, nos ha permitido desarrollar y patentar un biosensor de SPR modulado en longitud de onda, denominado **biosensor  $\lambda$ MSPR** (del inglés, *Lambda-modulated Surface Plasmon Resonance biosensor*). La principal diferencia entre el biosensor MOSPR y el  $\lambda$ MSPR es que en el primero, la luz es un elemento pasivo y el transductor activo, mientras que en el sensor  $\lambda$ MSPR la luz será el elemento activo del sensor y el transductor el pasivo.

## 6.2. Diseño del sensor $\lambda$ MSPR

En el sensor  $\lambda$ MSPR, la fuente de luz ha de tener una longitud de onda central ( $\lambda_0$ ) y una componente modulada; es decir, la longitud de onda incidente ha de variar entre dos extremos ( $\lambda_0 \pm \Delta\lambda/2$ ). Comercialmente se pueden encontrar diferentes fuentes de luz cuya longitud de onda de emisión pueda ser variada de una forma controlada. Sin embargo, el coste de todas ellas es muy elevado (más de 20.000 €), impidiendo con ello que el biosensor  $\lambda$ MSPR pudiera ser catalogado como dispositivo de bajo coste (una de las grandes cualidades de los biosensores SPR). No obstante, los diodos láser poseen la capacidad de variar la longitud de onda de emisión de un láser mediante la *variación de la temperatura* de la cavidad láser o la *variación de su corriente de alimentación*. Ambos parámetros, que normalmente son controlados para estabilizar la longitud de onda y la potencia de emisión, podrían ser utilizados para variar la  $\lambda$  de una forma controlada (modulándola entre dos valores). A pesar de que ambas técnicas permiten variar la longitud de onda de emisión, su naturaleza y características son muy diferentes [168]. Así:

- La *variación de temperatura* de la cavidad del láser es capaz de generar grandes cambios, tanto en la potencia como en la  $\lambda$ . Sin embargo, la velocidad de variación es lenta e inestable al ser consecuencia de la variación de la constante dieléctrica del medio activo.
- La *variación de la corriente de inyección* genera cambios más pequeños, pero permite mayores y más estables frecuencias de modulación al ser consecuencia de la variación de la denominada *energía de bombeo* que produce la *inversión de población*. Por esta razón, esta ha sido la técnica empleada para desarrollar el biosensor  $\lambda$ MSPR.

### Esquema básico del sensor

En la Figura 73 se muestra el esquema básico del sensor  $\lambda$ MSPR inicialmente desarrollado. Como se puede apreciar, este primer prototipo fue desarrollado a partir del sistema experimental del sensor MOSPR descrito en el capítulo anterior. El hecho de poder partir de un sistema experimental montado y testado fue de gran utilidad a la hora de diseñar y construir el primer prototipo del sensor  $\lambda$ MSPR. Los elementos principales que componen el sensor  $\lambda$ MSPR son fundamentalmente los mismos que forman un sensor MOSPR, y por lo tanto, los mismos que componen un sensor SPR de intensidad. La principal diferencia entre el sensor MOSPR y el  $\lambda$ MSPR es que, en

este último, será necesario adquirir una señal de referencia (*REF*) para poder determinar la variación de reflectancia debida a  $\Delta\lambda$ .

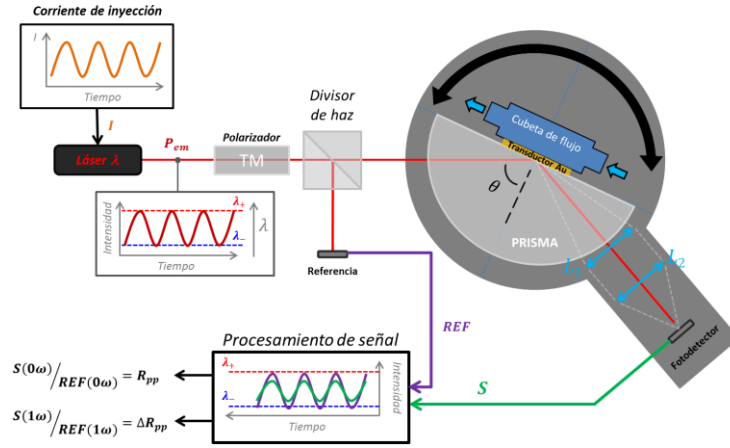


Figura 73 – Esquema básico del sistema inicial del sensor  $\lambda$ MSPR.

### Sistema de adquisición y procesamiento de la señal

El hecho de tener que adquirir una señal de referencia para poder determinar la variación relativa de reflectancia obliga a modificar el sistema de adquisición y procesamiento de señal empleado en el sensor MOSPR. Esta necesidad surge del hecho de que al generar la  $\Delta\lambda$  mediante la variación de la corriente de inyección ( $I$ ) no sólo se está modificando la longitud de onda de emisión, sino que también se modifica la potencia de emisión del láser ( $P_{em}$ ). Como se deduce del desarrollo de ecuaciones indicado más abajo, la variación de la potencia de emisión genera un término extra en el término asociado a la frecuencia fundamental de la señal recogida por el fotodetector ( $S$ ), de tal forma que el cociente entre la magnitud de la frecuencia fundamental y del primer armónico no se corresponde con  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ .

Por lo tanto, sea  $I = I_0 + \Delta I \cdot \sin(\omega \cdot t)$  la corriente de inyección sinusoidal aplicada al diodo láser y  $P_{em} = P_0 + \Delta P \cdot \sin(\omega \cdot t)$  su potencia de emisión. Si, por simplicidad, se supone que  $P_{em}$  es la potencia que incide sobre el sustrato, entonces la señal  $S$  será el producto de dicha potencia y del coeficiente de reflexión  $R$ :

$$S = P_{em} \cdot R \quad (61)$$

Descomponiendo el coeficiente de reflexión en serie de Fourier y despreciando los términos superiores al 2º armónico, el coeficiente de reflexión será:

$$R = R_0 + \Delta R_{1\omega} \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Delta R_{2\omega} \cdot \sin(2\omega \cdot t) \quad (62)$$

De tal forma que, la intensidad de luz registrada por el fotodetector será:

$$S = (P + \Delta P \cdot \sin(\omega \cdot t)) \cdot (R_0 + \Delta R_{1\omega} \cdot \sin(\omega \cdot t) + \Delta R_{2\omega} \cdot \sin(2\omega \cdot t)) \quad (63)$$

Desarrollando la ecuación ( 63 ) y agrupando los términos asociados a cada frecuencia se obtiene que, debido a los términos cruzados:

$$S_0 = P_0 \cdot R_0 + \frac{\Delta P \cdot c}{2} \quad (64)$$

$$S_{1\omega} = R_0 \cdot \Delta P + P_0 \cdot \Delta R_{1\omega} \quad (65)$$

De esta forma se obtiene que, a diferencia de como ocurría en el sensor MOSPR, el cociente  $S_{1\omega}/S_0 \neq \Delta R_{pp}/R_{pp}$  (es decir de  $\Delta R_{1\omega}/R_0$ ). Sin embargo, si mediante un divisor de haz se divide en dos haces de igual potencia el haz incidente y se toma uno de los haces como señal de referencia, se tendrá que  $REF = P_{em}/2$ . De esta forma, bastará con dividir ambas señales ( $REF$  y  $S$ ) de forma sincronizada y obtener el coeficiente de reflexión:

$$S/REF = P_{em} \cdot R / (P_{em}/2) = 2 \cdot R \quad (66)$$

Por ello, en el caso de la modulación en lambda,  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}$  vienen determinados por la magnitud del termino constante dc y del primer armónico, respectivamente, obtenidos del cociente de la intensidad de luz reflejada  $S$  entre la señal de referencia  $REF$ , permitiendo obtener así la variación relativa de reflectancia debida a  $\Delta\lambda$  ( $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ ). De esta forma, en el caso del sensor  $\lambda$ MOSPR, la señal de disparo del sistema síncrono de adquisición será la señal de referencia. Ambas señales deben estar en fase para que el cociente proporcione acceso al coeficiente de reflexión, teniendo que realizar el análisis FFT de cada señal individual y del cociente entre ambas. A diferencia del sensor MOSPR, en este caso las señales adquiridas serán sinusoidales y no cuadradas.

### **Sistema de control y visualización de datos**

Al tener que modificar la adquisición y el procesamiento de señal será necesario modificar el sistema de control y visualización de datos. En concreto, se tendrán que controlar y visualizar un mayor número de parámetros y señales, ya que en este sistema se adquieren/procesan dos señales y además se ha de procesar el cociente de estas. La Figura 74 muestra una captura de pantalla del *software de control y visualización de datos*, en el cual se pueden observar las señales temporales y los espectros de la señal de referencia, del sensor y del cociente de ambas.

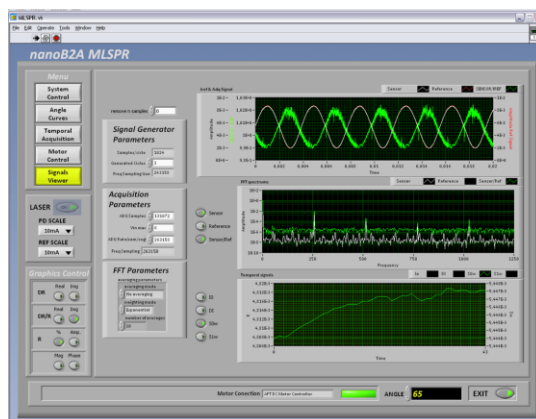


Figura 74 – Captura de pantalla del sistema de visualización de datos.

### Transductor del sensor $\lambda$ MSPR

Respecto al tipo de transductor, el biosensor  $\lambda$ MSPR puede utilizar el mismo tipo de transductor plasmónico (Au/Ti) empleado en el caso del biosensor SPR de intensidad (ver Figura 75). De esta forma, el sistema experimental empleado puede fácilmente actuar como sensor SPR de intensidad o como sensor  $\lambda$ MSPR. Esto es una notable cualidad de la técnica de modulación en lambda, ya que permite comparar de forma rápida y sencilla ambos dispositivos, y todo ello sin necesidad de cambiar el transductor. Sin embargo, al igual que sucede en el caso del sensor MOSPR, la optimización del espesor del transductor empleado será mucho más importante en el caso del sensor  $\lambda$ MSPR que en el sensor SPR convencional.

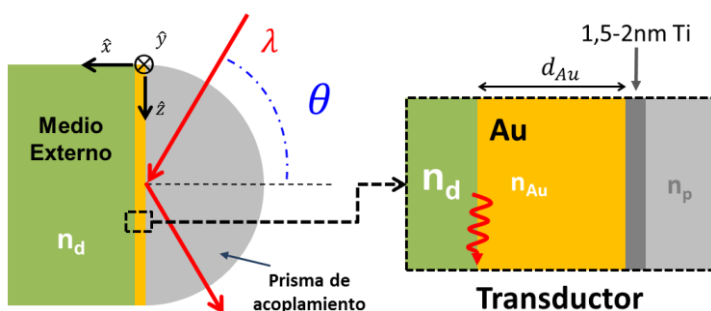


Figura 75 – Vista esquemática del transductor y de las condiciones de medida empleadas en el biosensor  $\lambda$ MSPR.

### 6.3. Análisis teórico

Como paso previo al desarrollo del sensor  $\lambda$ MSPR resulta necesario analizar teóricamente ciertos aspectos fundamentales del mismo. Gracias al MMT será posible simular las curvas angulares de reflectancia y de variación relativa de reflectancia generadas mediante la modulación en  $\lambda$  del SPP, así como determinar la sensibilidad del biosensor  $\lambda$ MSPR en función de la longitud de onda central de incidencia  $\lambda_0$ . Para realizar dichas simulaciones se implementaron varios programas de cálculo en el entorno de desarrollo MATLAB, el cual al estar orientado al cálculo matricial resulta muy adecuado para este propósito.

#### 6.3.1. Curvas angulares

Como ya se comentó anteriormente, en la configuración de Kretschmann el espesor de la lámina metálica (en este caso Au) determina la calidad del acople entre el haz incidente y el SPP excitado en esta configuración (el MII). Únicamente cuando el espesor del metal sea igual al espesor de corte de MII (determinado por  $k_{spp}^{MII}$ ) se producirá una transferencia total de energía y por lo tanto, la reflectancia observada en el ángulo de excitación del SPP será prácticamente nula. Cuando eso sucede,  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  experimenta un brusco incremento como consecuencia de la disminución del denominador, maximizándose la pendiente de detección (ver apartado 4.2).

Por lo tanto, como primer cálculo, resultaría interesante determinar la influencia del espesor  $d_{Au}$  en la curva angular  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ . Para analizar esto, se determinan las curvas angulares de  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  de la estructura descrita en la Figura 75 para diferentes espesores  $d_{Au}$  en torno al valor óptimo (previamente determinado en la Figura 31-a)). El cálculo fue realizado para dos longitudes de onda centrales  $\lambda_0$  (660 y 780 nm) y para  $\Delta\lambda = 1$  nm. Teóricamente, ajustando el valor de del espesor de Au, sería posible alcanzar valores de reflectancia prácticamente nulos en el ángulo de excitación del SPP. Cuando esto sucede, el parámetro  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  tiende a infinito y el análisis teórico pierde toda utilidad. Ya que experimentalmente no es posible obtener mínimos de reflectancia iguales a cero, el  $d_0(Au)$  teórico seleccionado para las simulaciones será aquel que nos proporcione mínimos de reflectancia en torno al 0,01 % (al estimar –según lo mostrado en la Tabla 5– que este podría ser nuestro valor experimental límite). En todos los cálculos, como medio externo se optó por un índice de refracción equivalente al del agua ( $n_d = 1.3323$  RIU). La Figura 76 muestra el resultado del cálculo realizado. De esta figura puede deducirse que:

- Efectivamente, la máxima variación relativa de reflectancia se produce para el  $d_{Au}$  en el que se alcanza el mínimo valor de intensidad en el ángulo de excitación del SPP; es decir, el espesor de corte del MII que optimiza el acoplamiento entre el haz incidente y el MII. De ahí que, tanto en las simulaciones como en los estudios experimentales, resulte fundamental emplear el espesor óptimo de Au asociado a la  $\lambda_0$  (determinado en Figura 31-a)).



- En el caso del biosensor  $\lambda$ MSPR, el valor de  $d_{Au}$  jugará un papel crítico en su respuesta sensora mucho mayor que el observado en el caso del biosensor MOSPR, ya que la anchura de la curva de resonancia de las estructuras MP es mucho mayor que la de las estructuras puramente plasmónicas.

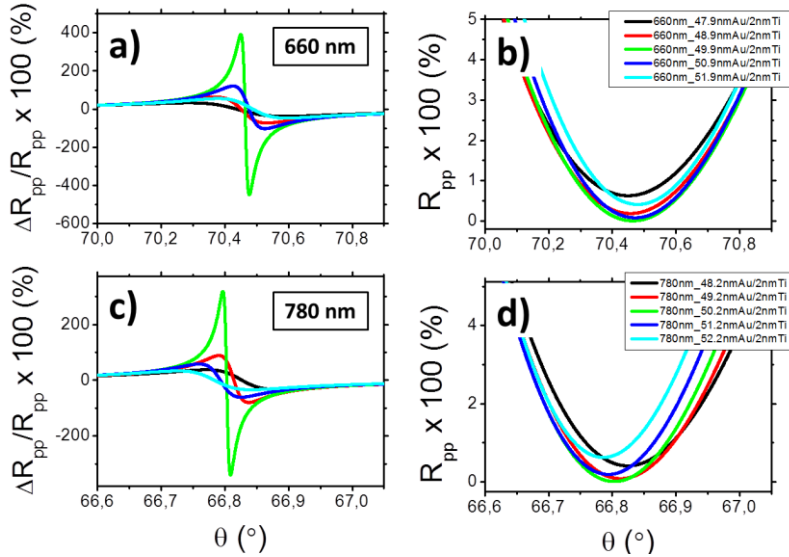


Figura 76 – (a) y (b) muestra las curvas angulares de  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  en función de  $d_{Au}$  para estructuras  $n_d=1.3323$  RIU/Au/2nm Ti/BK7 en las que  $\lambda_0 = 660$  nm,  $\Delta\lambda = 1$  nm, mientras que en (c) y (d)  $\lambda_0 = 780$  nm,  $\Delta\lambda = 1$  nm.

También resultaría muy útil determinar (para una  $\Delta\lambda$  constante) las curvas angulares de reflectancia  $R_{pp}$  y de variación de reflectancia  $\Delta R_{pp}$  de la luz  $p$ -polarizada, para diferentes longitudes de onda  $\lambda_0$ . La Figura 77 muestra las curvas angulares de  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}$  para cuatro valores característicos de  $\lambda_0$  correspondientes al rango del espectro visible 633, 660, 720 y 780 nm y para una variación de longitud de onda constante de  $\Delta\lambda = 1$  nm.

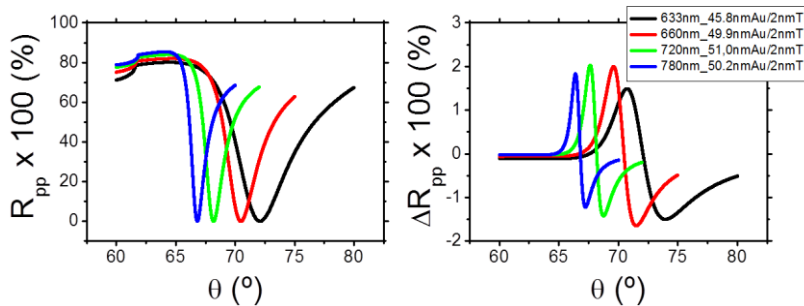


Figura 77 – Curvas angulares de  $R_{pp}$  (izquierda) y  $\Delta R_{pp}$  (derecha) en estructuras  $n_d=1.3323$  RIU/Au/2nm Ti/BK7 cuando  $\lambda_0 = 633, 660, 720$  y  $780$  nm y  $\Delta\lambda = 1$  nm.

La Figura 77 muestra que:

- Como ya se demostró anteriormente, cuanto mayor sea  $\lambda_0$ , más estrecha será la resonancia y mayor pendiente angular alcanzará la curva de resonancia.
- La curva angular  $\Delta R_{pp}$  también se vuelve más estrecha a medida que aumenta la longitud de onda incidente. Sin embargo, a pesar de que la pendiente angular de la curva de resonancia aumenta progresivamente, el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  no sigue esta tendencia. Según se aprecia,  $\Delta R_{pp}$  alcanza un valor máximo en torno a los 700 nm.

La mejor forma de interpretar la influencia de  $\lambda_0$  y  $\Delta\lambda$  en la respuesta angular de las curvas es a través del cálculo y análisis de ciertos **parámetros representativos** (gráficamente definidos en la ) como son: la anchura de la curva angular de  $R_{pp}$  (abreviado como AA y determinada para  $R_{pp} = 5\%$ ), el valor de la derivada angular de  $\Delta R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP (denotado como  $\partial(\Delta R_{pp})/\partial\theta$ ), el valor máximo de  $\Delta R_{pp}$  (denotado como  $\max \Delta R_{pp}$ ) y la variación angular de  $\theta_{spp}$  debida a la modulación  $\Delta\lambda$  (denotado como  $\Delta\theta_\lambda$  y definido en la Figura 72).

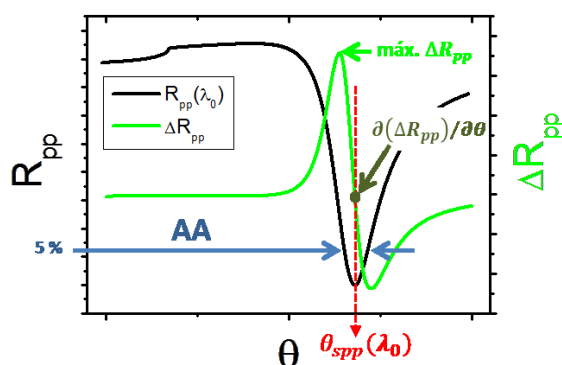


Figura 78 – Definición gráfica de los parámetros representativos.

En la Figura 79 se puede observar, para  $\Delta\lambda = 1\text{ nm}$ , el valor de estos parámetros en función de la longitud de onda central incidente  $\lambda_0$ . El rango de longitudes de onda analizadas será el correspondiente a la zona visible del espectro electromagnético en la que es posible excitar el SPP  $\lambda \in [550, 780]\text{ nm}$ . Esta figura muestra que, al menos en el rango de longitudes de onda analizadas, la anchura angular de la curva  $R_{pp}$  y el desplazamiento angular  $\Delta\theta_\lambda$  del ángulo de excitación del SPP debida a la modulación  $\Delta\lambda$ , disminuyen a medida que aumenta  $\lambda_0$ . Sin embargo, la relación de la pendiente angular de  $\Delta R_{pp}$  evaluada en el ángulo de excitación del SPP (el ángulo de medida del  $\lambda\text{MSPR}$ ) aumenta a medida que  $\lambda_0$  incrementa su valor. La dependencia de estos tres parámetros con la longitud de onda es mucho más acusada a bajas longitudes de onda que altas. Finalmente, se observa que para valores superiores a los 660 nm, el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  se mantiene aproximadamente constante (entorno al 2%). De este resultado se deduce que:

- A pesar de que  $\Delta\theta_\lambda$  disminuye considerablemente al aumentar la longitud de onda (debido a que la derivada de la permitividad dieléctrica del oro respecto a longitud de onda disminuye a altas longitudes de onda), el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  permanece constante al reducirse la anchura angular de  $R_{pp}$  y por tanto, incrementarse su pendiente angular. Sin embargo, a pesar de que el valor máximo de  $\Delta R_{pp}$  permanece constante, su curva angular (y por lo tanto, su deriva) se incrementan notablemente hasta alcanzar un valor de saturación entorno al 6%/°.
- Del análisis anterior se desprende que la elección de la longitud de onda central de modulación óptima para el sensor  $\lambda$ MSPR no será trivial y requerirá de un análisis de su sensibilidad similar al realizado para el sensor MOSPR, lo cual también es consecuencia de la disminución de la anchura angular de  $R_{pp}$ .

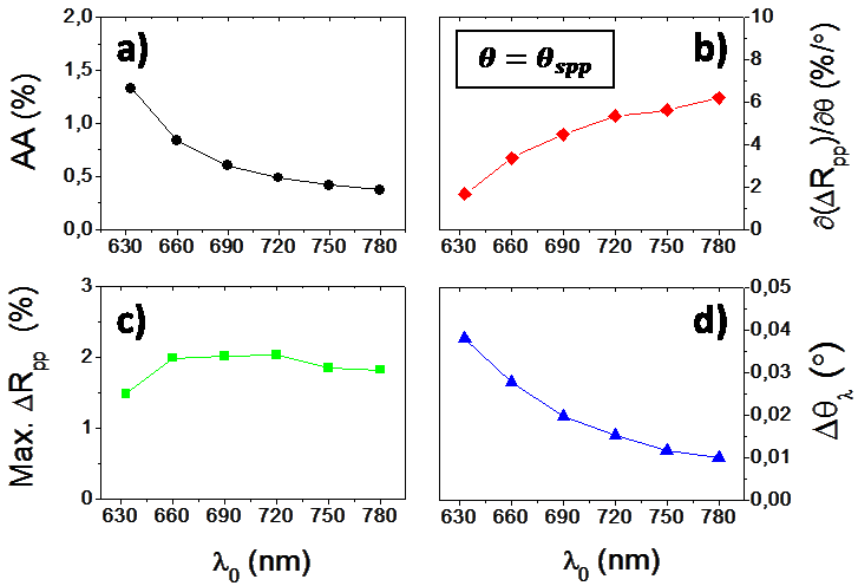


Figura 79 – Parámetros representativos del biosensor  $\lambda$ MSPR en función de  $\lambda_0$  para una estructura  $n_d=1.3323$  RIU/Au/2nm Ti/BK7 con el espesor  $d_{Au}$  óptimo para cada  $\lambda_0$  y cuando  $\Delta\lambda = 1$  nm.

Finalmente, la Figura 80 muestra que, para  $\Delta\lambda \ll \lambda$ , la dependencia de los parámetros característicos con  $\Delta\lambda$  es lineal en el caso de los parámetros asociados a la modulación ( $\Delta\theta_\lambda$ ,  $\Delta R_{pp}$  y  $\partial(\Delta R_{pp})/\partial\theta$ ) y no afecta a la anchura angular de la curva angular de reflectancia a  $\lambda_0$ .

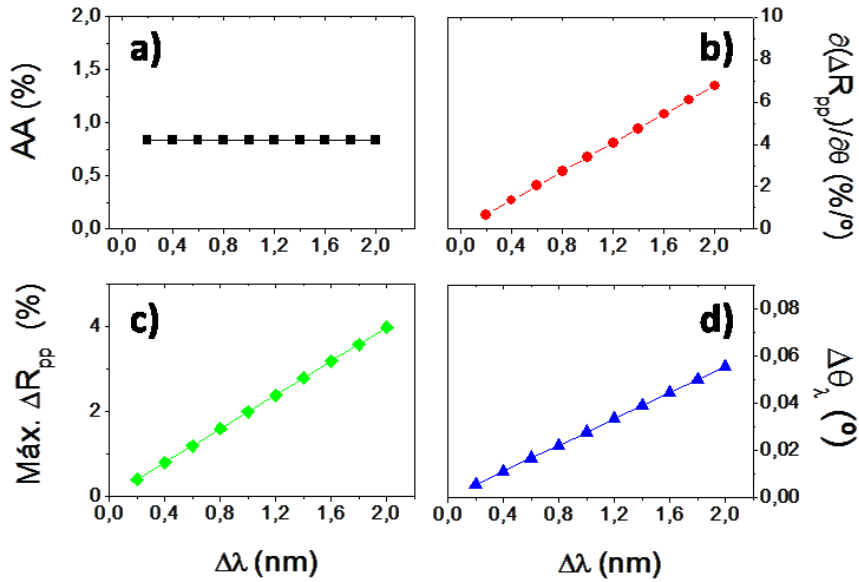


Figura 80 – Parámetros representativos del biosensor  $\lambda$ MSPR en función de  $\Delta\lambda$  para una estructura  $n_d=1.3323$  RIU/Au/2nm Ti/BK7 con el espesor  $d_{Au}$  óptimo para cada  $\lambda_0 = 660$  nm.

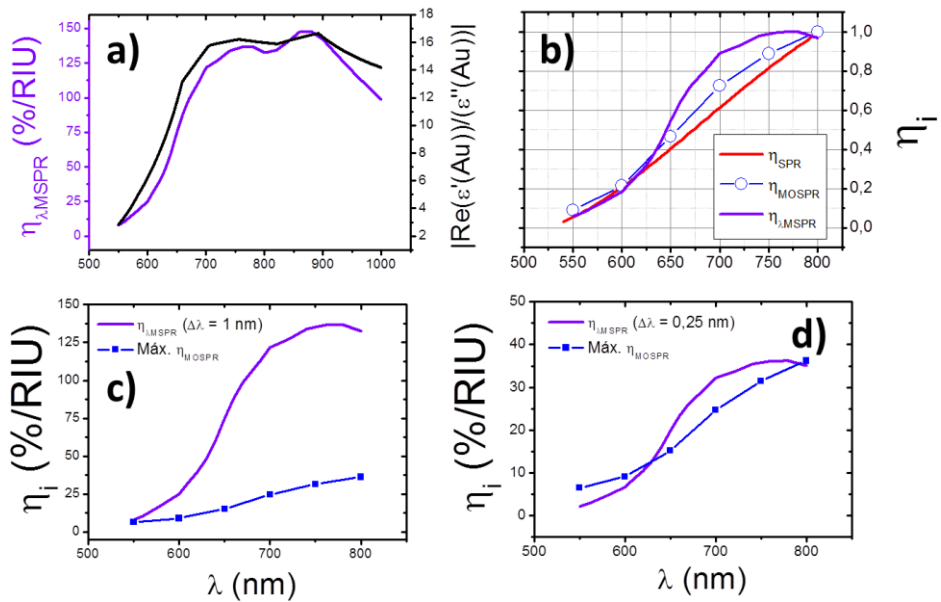
### 6.3.2. Sensibilidad en función de la longitud de onda

La compleja dependencia exhibida por los parámetros representativos del biosensor  $\lambda$ MSPR sugiere que, al igual que se hizo en el caso del MOSPR, la determinación de la sensibilidad de este biosensor en función de la longitud de onda se realice a través de una figura de mérito. Así, de forma similar a como se hizo en el apartado 5.3.2 de esta memoria, la sensibilidad del biosensor  $\lambda$ MSPR quedará determinada por el parámetro  $\eta_{\lambda MSPR}$ , denominado *sensibilidad* del biosensor  $\lambda$ MSPR, y definido como:

$$\eta_{\lambda MSPR} = \frac{\delta(\Delta R_{pp})}{\delta n} \quad \text{evaluada en } \theta = \theta_{spp} \quad (67)$$

En el caso del biosensor  $\lambda$ MSPR, el parámetro  $\eta_{\lambda MSPR}(\lambda)$  ha de ser evaluado para un transductor plasmónico cuyo espesor  $d_{Au}$  sea aquel que optimice la resonancia del transductor a esa longitud de onda (la correspondiente a la longitud de onda central  $\lambda_0$ ), de forma similar a como se ajustaba  $d_{Aubottom}$  en el caso del biosensor MOSPR, para así optimizar la resonancia de la estructura MP. De esta forma, la comparativa únicamente será válida cuando los espesores del transductor a cada  $\lambda_0$  estén optimizados. La Figura 81-a) muestra la dependencia del parámetro  $\eta_{\lambda MSPR}$  con la longitud de onda central incidente cuando  $\Delta\lambda = 1$  nm. Además, en esta figura también se representa la dependencia espectral del cociente de la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica del Au. De esta figura puede concluirse que:

- A medida que se incrementa la longitud de onda incidente, el valor de  $\eta_{\lambda\text{MSPR}}$  también se incrementa hasta alcanzar un primer valor máximo (máximo local) entorno a los 750 nm. A partir de esa longitud de onda, la sensibilidad presenta un mínimo local y un máximo absoluto en 800 y 850 nm, respectivamente. A partir de 900 nm el valor de  $\eta_{\lambda\text{MSPR}}$  desciende considerablemente.
- La compleja dependencia espectral de  $\eta_{\lambda\text{MSPR}}$  está claramente gobernada por la relación espectral entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica del metal (en este caso Au). Conocer este aspecto posee una gran importancia práctica, ya que gracias a esto se simplifica y acelera enormemente la determinación de la longitud de onda óptima de trabajo de cualquier tipo de estructura plasmónica empleada como transductor del biosensor  $\lambda$ MSPR.



**Figura 81 – (a) Dependencia espectral de  $\eta_{\lambda\text{MSPR}}$  de un transductor Au/2nm Ti y del cociente entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica del Au. (b) Sensibilidad normalizada del sensor SPR, MOSPR y  $\lambda$ MSPR. Respuesta espectral (teórica) de la sensibilidad de los sensores MOSPR y  $\lambda$ MSPR para (c)  $\Delta\lambda = 1$  nm y (d)  $\Delta\lambda = 0,25$  nm.**

La Figura 81-b) muestra el incremento de la sensibilidad normalizada (cada una respecto a su valor máximo) en función de la longitud de onda de los tres sensores analizados durante esta tesis, todos ellos con transductores optimizados para cada dispositivo y  $\lambda$ . Los valores normalizados de sensibilidad **no** permiten comparar los valores absolutos de sensibilidad obtenidos para cada sensor, pero sí que permiten analizar la ganancia de sensibilidad experimentada por cada dispositivo al aumentar la longitud de onda incidente. Según esto:

- Conocer la respuesta espectral de la sensibilidad es de crucial importancia a la hora de realizar una comparativa correcta entre ambos dispositivos y permite extrapolar a otras  $\lambda$  los valores de sensibilidad experimentales obtenidos a una determinada longitud de onda. Así por ejemplo, la Figura 81-b) muestra que la sensibilidad de los tres dispositivos prácticamente se duplica al aumentar la longitud de onda incidente de 660 nm a 800 nm.
- En el rango visible, el biosensor SPR y MOSPR poseen una mayor sensibilidad cuanto mayor sea la longitud de onda empleada. Sin embargo, el sensor  $\lambda$ MSPR alcanza un valor máximo en torno a los 750 nm y se mantiene prácticamente constante hasta los 800 nm.

Finalmente, la Figura 81-c) y d) muestran una comparativa entre la sensibilidad en función de la longitud de onda del sensor MOSPR y del  $\lambda$ MSPR. Estos dos parámetros sí que pueden ser comparados en valor absoluto, ya que ambos se refieren a la misma magnitud. De la comparativa se deduce que:

- En el caso de que ambos dispositivos posean el mismo nivel de ruido experimental y el mismo valor mínimo de reflectancia  $R_{pp}(\theta_{spp})$ , bastará con una  $\Delta\lambda = 0,25 \text{ nm}$  para que la respuesta sensora de ambos dispositivos sea la misma.
- En el sensor MOSPR la modulación del SPP está limitada por las propiedades MO del material ferromagnético empleado. Sin embargo, en el sensor  $\lambda$ MSPR no existe tal limitación. Como se vio en la Figura 80, en el caso de que  $\Delta\lambda \ll \lambda$ , la modulación será directamente proporcional a  $\Delta\lambda$ . De esta forma, cuanto mayor sea  $\Delta\lambda$  mayor será la sensibilidad del sensor  $\lambda$ MSPR. Esto convierte a este dispositivo en un biosensor SPR-modulado de enorme potencial, ya que su respuesta sensora dependerá fundamentalmente de la capacidad de generar una variación grande y estable (es decir, con el menor ruido experimental) de la longitud de onda incidente  $\Delta\lambda$ .

## 6.4. Montaje experimental preliminar

La Figura 82 muestra el primer sistema experimental de  $\lambda$ MSPR desarrollado durante esta tesis doctoral, y en la Tabla 9 se describen cada uno de los elementos del montaje. Como se puede apreciar, el cambio más visible en este sistema respecto al descrito en el apartado 5.5 es la inclusión de una señal o canal de referencia, lo cual obliga a modificar el tipo de procesamiento de señal. En el biosensor  $\lambda$ MSPR se empleará un procesamiento totalmente software de la señal, utilizando como tarjeta de adquisición una PCI-6251 de *National Instrument* (la misma que en el caso del biosensor MOSPR) montada en un ordenador Intel Core 2 6400 a 2.13 GHz y con 1 Gb memoria RAM. Sin embargo, esta no es la única modificación importante que hemos realizado respecto al sistema experimental final del sensor MOSPR. También hemos

modificado la longitud de onda incidente, aumentando esta hasta los 780 nm por ser la longitud de onda del rango visible a la cual la sensibilidad, tanto del sensor SPR como del  $\lambda$ MSPR, es máxima. Respecto al sistema de flujo, únicamente se ha sustituido la válvula de inyección Model 5020 de Rheodyne por el modelo IDEX-451 de Upchurch Scientific Inc. debido al mejor funcionamiento de esta última.

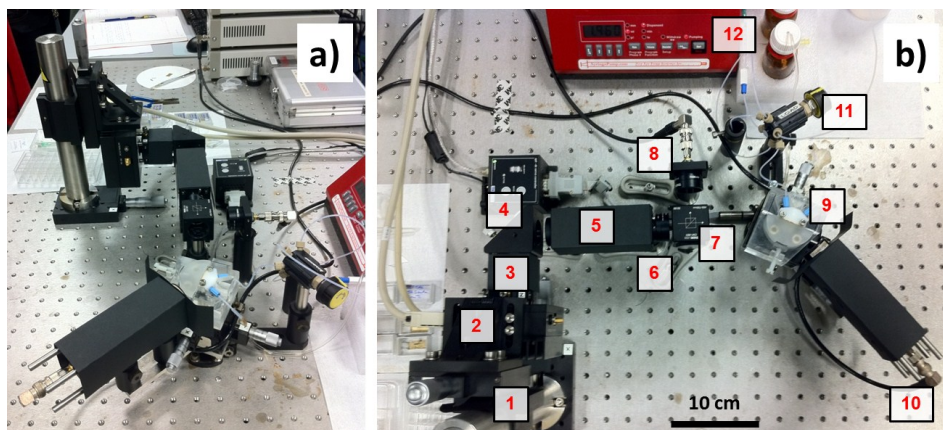


Figura 82 – Sistema experimental inicial del sensor  $\lambda$ MSPR inicialmente desarrollado. (a) Vista general y (b) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 9.

Tabla 9 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 82.

No.	ELEMENTO	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
1	Posicionar del láser	Sistema YZ	Formado por dos plataformas de desplazamiento colocadas a 90° (2x PT1/M I <sup>I</sup> ).
2	Diodo láser (780 nm)	EYP-DFB-780 <sup>I</sup> o DL7140-2015 <sup>II</sup>	Un sistema LTC100-B <sup>II</sup> nos permite controlar y estabilizar en temperatura el diodo láser.
		A414TM-B <sup>II</sup>	Lente esférica de f=3 mm que permite colimar el haz.
3	Óptica del láser	CXY1 <sup>II</sup>	Posicionador de dos ejes. Nos permite posicionar la lente en el plano $\perp$ al eje óptico.
		IO-D-780-VLP <sup>II</sup>	Aislador óptico que protege el diodo láser, evitando que cualquier reflejo llegue hasta la cavidad del láser.

4	Espejo	PF10-03-P01 <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma cinemática (KCB1 <sup>II</sup> ).
5	Polarizador	GTH10M <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma rotatoria que permite ajustar el eje de polarización (CRM1L/M <sup>II</sup> ).
7	Divisor de haz	CM1-BS2 <sup>II</sup>	Divide el haz incidente en dos, dividiendo la potencia del haz incidente al ~50 %.
8	Fotodiodo de referencia	SM05PD1A <sup>II</sup>	Conectado a un conversor I/V (PDA200C <sup>II</sup> ).
9	Sistema de medida angular de reflectancia	-	La misma que para el biosensor MOSPR. Únicamente, se retirará el electroimán.
10	Fotodiodo de medida	SM05PD1A <sup>II</sup>	Conectado a un conversor I/V (PDA200C <sup>II</sup> ).
11	Válvula de inyección	IDEX-451 <sup>III</sup>	-
12	Bomba de flujo	NE300 <sup>IV</sup>	Bomba de jeringa para crear el flujo continuo.

<sup>I</sup> Eagleyard Photonics – <http://www.eagleyard.com/>    <sup>II</sup> Thorlabs – <http://www.thorlabs.de/>

<sup>III</sup> Upchurch Scientific Inc. – <http://webstore.idex-hs.com/Products/>

<sup>IV</sup> New Era Pump Systems – <http://www.syringepump.com/>

## 6.5. Análisis y desarrollo experimental

Una vez diseñado y montado el sistema experimental que compone el sensor  $\lambda$ MSPR se está en condiciones de realizar una caracterización experimental del mismo, la cual nos permitirá evaluar el sistema experimental descrito en el apartado anterior. Existen tres elementos que deben ser analizados en detalle: la *fente de luz*, el *sistema óptico de detección* y el *transductor*.

### 6.5.1. Fuente de luz

Los diodos láser son las fuentes de luz coherente más utilizadas, debido fundamentalmente a su bajo coste, vida media, eficiencia, fiabilidad y bajo consumo. Se utilizan en multitud de áreas y hoy en día son un componente optoelectrónico fundamental. En este estudio se han analizado dos tipos distintos de diodos láser: un diodo láser de estructura heterogénea (modelo DL7140-201S de la marca Sanyo) y uno de retroalimentación distribuida (modelo EYP-DFB-780 de la marca EagleYard), más conocido en inglés como *Distributed Feedback Laser (DFB)*. La longitud de onda



central de emisión de ambos láseres se encuentra en torno a los 780 nm, mientras que la potencia de salida es de alrededor de 100 mW. Ambos diodos fueron estabilizados y controlados en temperatura gracias a un controlador comercial (modelo LTC100-B de la marca Thorlabs) y alimentados mediante la tarjeta de adquisición y el software descritos en apartado 6.4.

Como ya se comentó anteriormente, la cantidad y calidad de la variación  $\Delta\lambda$  generada por la fuente de luz será determinante en la respuesta sensora del sensor  $\lambda$ MSPR. De ahí que el análisis y desarrollo experimental del sensor  $\lambda$ MSPR deba comenzar por la caracterización de la fuente de luz. En este apartado se analiza la *magnitud, estabilidad y dependencia con la temperatura* de la longitud de onda central de emisión  $\lambda_0$  y de la variación  $\Delta\lambda$  de la longitud de onda generada en un diodo láser como consecuencia de la utilización de una corriente de inyección alterna  $I = I_0 + \Delta I \cdot \sin(\omega \cdot t)$ . No es habitual que estos parámetros sean proporcionados por los fabricantes y por lo tanto, deben ser analizados de forma experimental en el propio sistema. Además, aunque dichos parámetros fueran proporcionados por el fabricante, es tal la dependencia de estos con otros factores (como por ejemplo: el tipo de sistema de control y estabilización de temperatura, la calidad de la señal de generación, los posibles reflejos, etc.), que resulta imprescindible realizar un análisis *in situ* del haz incidente. Para llevar a cabo este estudio, bastará con realizar un rápido análisis espectral del haz incidente. Para ello, se empleó un espectrómetro comercial (Shamrock SR-303i, Andor) conectado a un detector CCD refrigerado (Newton, Andor), el cual es capaz de alcanzar resoluciones de 0,025 nm en una anchura espectral de análisis de unos 25 nm. Debido a la dificultad de sincronizar la frecuencia de la señal de modulación con la de adquisición del espectrómetro, resulta más sencillo analizar las características del diodo láser de una forma estática (es decir, tomando una frecuencia de modulación nula  $\omega = 0$  y variando la amplitud de la corriente de alimentación  $\Delta I$ ). Sin embargo, esta estrategia no sirve para analizar la estabilidad de la modulación del diodo láser. La estabilidad de la longitud de onda de emisión y de su variación puede ser analizada de forma dinámica si se analiza el promedio de los espectros acumulados durante un intervalo de tiempo mucho mayor que el período de modulación.

#### 6.5.1.1. Láser de estructura heterogénea

En la Figura 83-a) se puede observar el espectro de emisión de este diodo (modelo DL7140-201S) a 25°C cuando  $\omega = 0$  cuando  $I = 50, 95$  y  $140$  mA. Estos valores se corresponden con la *corriente umbral*, la *corriente central* y la *corriente máxima* soportada por este diodo láser, respectivamente. Como se ve, a esa temperatura la longitud de onda de emisión del diodo está entorno a los 777 nm y entre el valor de corriente máximo y umbral hay una diferencia de unos 2 nm. La Figura 83-b) muestra la variación con la temperatura de la longitud de onda asociada a la corriente central de 95 mA. Como se puede ver, la corriente central de emisión del láser varía enormemente con la temperatura (para una variación de temperatura de 20° C se consigue una variación de  $\lambda$  de casi 6 nm). Además de esto, la Figura 83-c) y la Figura 83-d) muestran que la máxima variación de la longitud de onda  $\Delta\lambda^{max} = \lambda(I_{max}) - \lambda(I_{umbral})$  se produce para una temperatura de 25° C, y que esta es ligeramente superior a los 2 nm. Finalmente, la Figura 83-e) y f) muestran el

promedio normalizado de 1000 espectros de 0.0025 s de duración, cuando el diodo láser es alimentado con una corriente alterna  $I_0 + \Delta I = 95 \pm 45 \text{ mA}$  a  $25^\circ\text{C}$  y para frecuencias de modulación de 2 Hz y 512 Hz, respectivamente. Como se deduce del análisis realizado, a pesar de que este diodo láser posee una gran  $\Delta\lambda^{\text{max}}$  y una razonable anchura espectral, no posee una modulación en longitud de onda estable, razón por lo cual no puede ser empleado como fuente de luz de un biosensor  $\lambda\text{MSPR}$ .

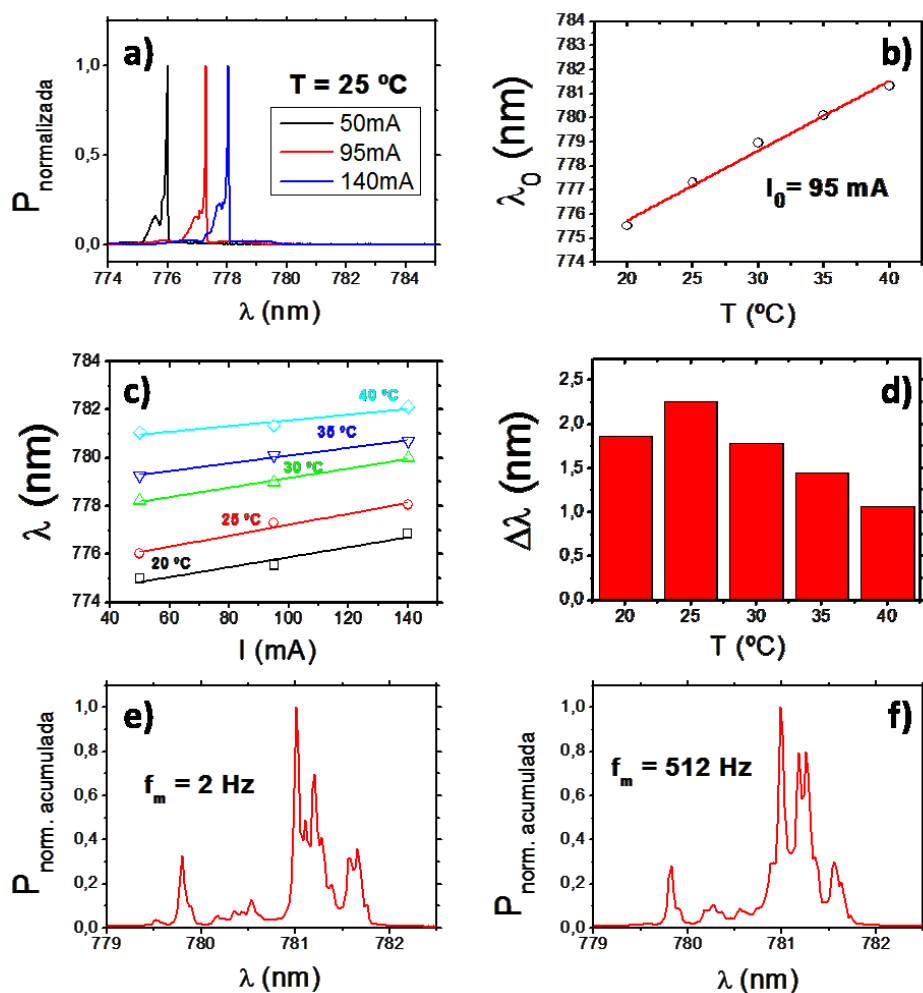


Figura 83 – Caracterización experimental del diodo láser de estructura heterogénea (modelo DL7140-2015 de la marca Sanyo).

#### 6.5.1.2. Láser retroalimentado distribuido (DFB)

Normalmente, los diodos láseres (como el analizado anteriormente) confinan la luz en el medio activo gracias a la reflexión producida en los extremos pulidos de la estructura de semiconductores que forma el diodo. En estos diodos, la variación de la corriente de alimentación genera que la luz confinada y amplificada en el medio activo salte entre los diferentes modos ópticos, cada uno de los cuales posee una

longitud de onda de emisión diferente. Los diodos DFB [169], los cuales integran una red de difracción en las inmediaciones del medio activo que permite confinar la luz en su interior, poseen una respuesta lineal y continua con la corriente de inyección. Como contrapartida, la variación de longitud de onda que experimentan es menor y su precio mayor (en torno a 1000 euros). A pesar de esto, debido a que su espectro de emisión es también mucho más estrecho que el de los láseres convencionales, resulta interesante analizar este tipo de diodos.

La Figura 84 muestra el resultado del análisis realizado para el diodo DFB (modelo EYP-DFB-780 de la marca EagleYard). La Figura 84-a) muestra los espectros de emisión a diferentes temperaturas (15, 25 y 35°C) cuando  $\omega = 0$  e  $I = 50, 110$  y  $180 \text{ mA}$ . Estos valores se corresponden con la *corriente umbral*, la *corriente central* y la *corriente máxima* soportada por este diodo láser, respectivamente. De la primera figura puede deducirse que la máxima  $\Delta\lambda^{\text{max}}$  se produce a 15°C (la mínima temperatura a la que podemos someter al diodo láser) y que esta es  $\sim 0.5 \text{ nm}$ . Si se compara este resultado con el obtenido para el diodo láser de estructura heterogénea, se observa que la  $\Delta\lambda^{\text{max}}$  alcanzada en este último es cinco veces mayor que la alcanzada en el DFB. En la Figura 84-b) se muestra el valor de la longitud de onda de emisión en función del valor de la corriente de inyección a diferentes temperaturas. En esta figura se observa que, a pesar de que la relación entre la longitud de onda de emisión y la corriente de inyección es aproximadamente lineal y continua, existen ciertos saltos que pueden afectar al procesamiento de señal. Más concretamente, las Figura 84-c) y d) muestran respectivamente, la longitud de onda y la potencia de emisión en función de la corriente de inyección para a una temperatura de 15°C. De estas figuras se deduce que ambos parámetros no son totalmente lineales con la corriente de inyección, que presentan discontinuidades y que además, las discontinuidades en potencia y en  $\lambda$  no se producen para los mismos valores de corriente de inyección y de alimentación. De entrada, la principal consecuencia de estas discontinuidades será que tanto la señal de referencia como la del sensor no serán totalmente sinusoidales, complicando con ello enormemente la interpretación de las señales y el análisis de la FFT. Observando atentamente la Figura 84-c) se aprecia que existe una región central en la que la variación de la longitud de onda es lineal y continua, pero en la que sin embargo apenas se alcanzan los  $0,2 \text{ nm}$  de modulación. La Figura 84-e) muestra los espectros de emisión asociados a cada una de las corrientes de inyección analizadas. Como se ve, la anchura de los espectros (de apenas  $0,1 \text{ nm}$ ) se mantiene constante al variar la amplitud de la corriente de inyección. Finalmente, la Figura 84-f) muestra el promedio normalizado de 1000 espectros de  $0.0025 \text{ s}$  de duración, cuando el diodo láser es alimentado con una corriente alterna  $I_0 + \Delta I = 120 \pm 60 \text{ mA}$  a una temperatura de 15°C y para cuatro frecuencias distintas de modulación. En este caso, puede apreciarse cómo la modulación en longitud de onda del DFB sí es estable, observándose una fuerte disminución en su magnitud con el aumento de la frecuencia. Sin embargo, a medida que aumenta la frecuencia de modulación la potencia de emisión se vuelve más lineal, lo cual sugiere que la elección de la frecuencia de modulación será un compromiso entre la magnitud y la linealidad de la modulación y que esta, sin duda, jugará un papel decisivo en la SNR del sensor  $\lambda$ MSPR.

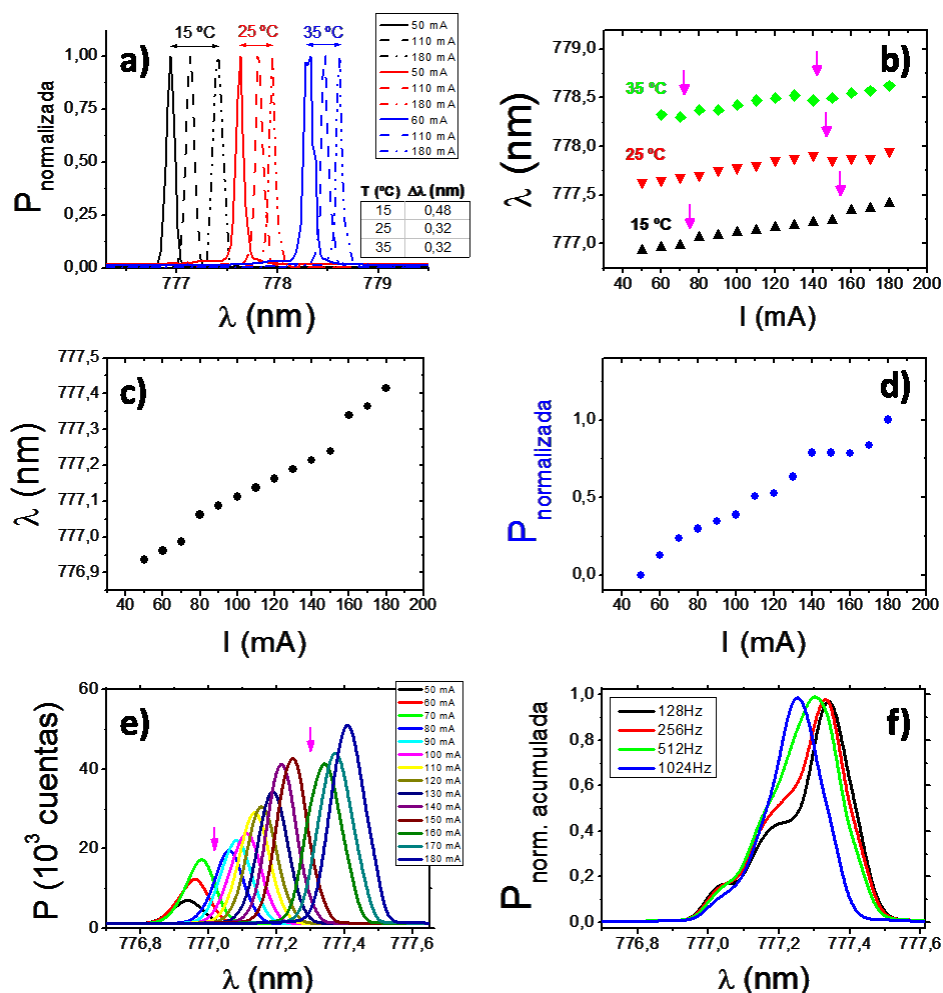
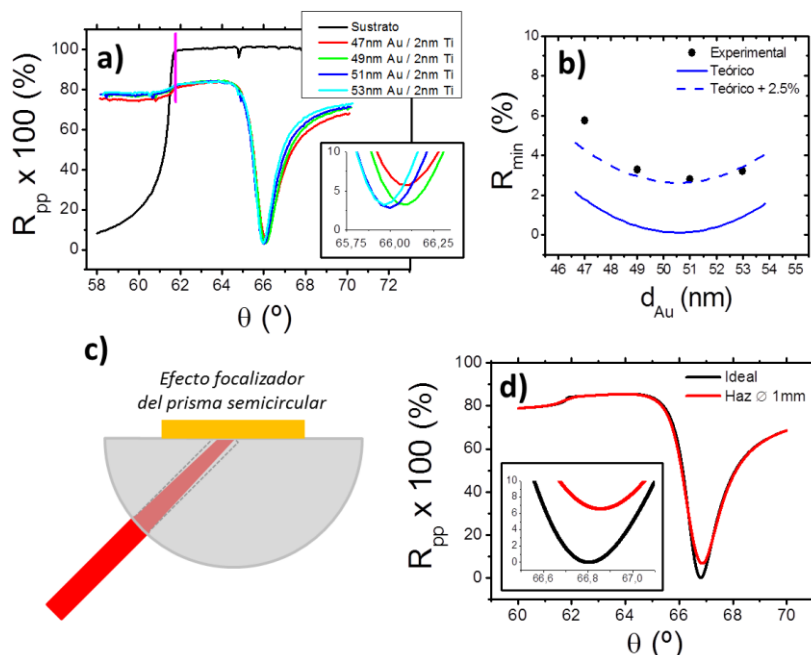


Figura 84 – Caracterización experimental del diodo DFB (modelo EYP-DFB-780 de la marca EagleYard).

### 6.5.2. Sistema óptico de detección

El sistema óptico de detección será otro elemento de suma importancia ya que, según indica la Figura 77, a mayor longitud de onda más estrecha será la curva angular de resonancia y por lo tanto, mayor será la resolución angular exigida al sistema experimental.

La Figura 85-a) muestra las curvas angulares de reflectancia para transductores  $Au/2\text{ nm Ti}$  crecidos mediante evaporación por haz de electrones sobre un sustrato de vidrio BK7. Como medio externo se empleó agua desionizada. La Figura 85-b) muestra cómo ninguno de los transductores crecidos entorno al valor de espesor teórico predicho por el MMT posee un mínimo de reflectancia inferior al 3 %. Es más, si se comparan los resultados experimentales con los calculados mediante los programas de simulación desarrollados, se observa que la diferencia entre ambos es aproximadamente constante e igual al 2.5 %.



**Figura 85 – Incremento experimental por los valores de reflectancia alcanzados en el ángulo de excitación del SPP de una estructura Au/2 nm Ti como consecuencia de la focalización que produce un prisma semicircular en un haz incidente no-puntual, cuyo diámetro no puede ser despreciado.**

Este hecho sugiere que existe algún impedimento físico en el sistema óptico de medida que impide observar mínimos de reflectancia inferiores a ese valor. Un hecho a tener en cuenta es que, en los cálculos teóricos se supuso que el haz incidente era una onda plano. Sin embargo, en realidad, el haz incidente es un haz gaussiano, colimado y con un tamaño finito en torno a los 0,5 mm de diámetro. El hecho de que el tamaño del haz incidente no pueda ser despreciado frente al diámetro del prisma (5 cm), impide que la focalización que experimenta el haz incidente al comportarse el prisma semicircular como una lente convergente (ver Figura 85-c) puede ser despreciada. Debido a la focalización, la reflectancia medida a cada ángulo de incidencia es en realidad el promedio de un determinado número de ángulos (definido por el tamaño del haz y del prisma). De esta forma, cuanto más estrecha sea la curva de resonancia mayor incremento sufrirá el mínimo de reflexión como consecuencia de este fenómeno. Conociendo el tamaño del haz y del prisma se puede estimar la magnitud de la focalización y con esta el número de grados que contribuyen a dicho promedio. La Figura 85-d) muestra el resultado de este cálculo en el caso de que el diámetro del haz incidente y del prisma sea de 1 mm y 5 cm, respectivamente. Esta figura demuestra que el efecto focalizador del prisma semicircular como consecuencia del tamaño finito del haz incidente, no es en absoluto despreciable. Por lo tanto, podemos concluir que el sistema óptico empleado para el MOSPR no es adecuado para este sistema, ya que al no poder obtener mínimos de reflectancia próximos a cero, la magnitud de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  se reduce considerablemente y con esta, la pendiente de detección del sensor  $\lambda$ MSPR.

En el caso del MOSPR, este fenómeno apenas influye al ser las curvas de resonancia muy anchas debido a la mayor absorción óptica que poseen los transductores MP.

De esta forma, el sistema óptico del sistema experimental empleado para desarrollar el sensor  $\lambda$ MSPR debe ser modificado para evitar este fenómeno. La primera opción que se barajó fue intentar reducir el tamaño del haz, mediante el uso de una lente colimadora con una mayor distancia focal o una menor apertura numérica. La pérdida de potencia que esto conlleva y la imposibilidad física de posicionar correctamente dicha lente en el sistema experimental empleado, motivo la búsqueda de otro tipo de soluciones. Una opción sencilla consiste en sustituir el prisma semicircular por uno trapezoidal (como el indicado en la Figura 86). De esta forma, al ser las caras de entrada y salida del prisma planas, el haz ya no será focalizado. Sin embargo, como contrapartida se tendrá que recalcular los ángulos de incidencia para obtener la curva real, eliminar el sistema de lentes que conducían el haz hasta el fotodetector y acercar este último lo máximo posible a la cara de salida del prisma.

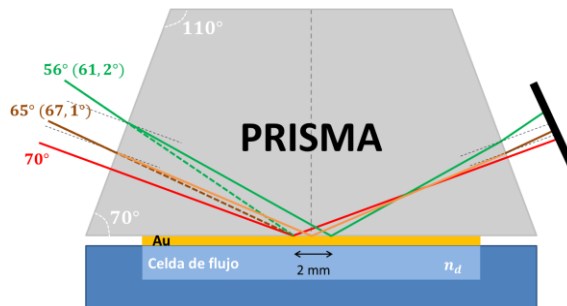


Figura 86 – Sistema óptico de excitación y detección del SPP en configuración de Kretschmann con un prisma trapezoidal.

### 6.5.3. Optimización del sistema experimental

De esta forma, realizando las modificaciones anteriormente descritas, el sistema experimental final empleado como sensor  $\lambda$ MSPR es el presentado y descrito en la Figura 87 y la Tabla 10.

Tabla 10 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 87.

No.	ELEMENTO	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
1	Posicionar del láser	Sistema YZ	Formado por dos plataformas de desplazamiento colocadas en un ángulo de 90° (PT1/M <sup>II</sup> ).
2	Diodo láser (780 nm)	EYP-DFB-780 <sup>I</sup>	Un sistema LTC100-B <sup>II</sup> nos permite controlar y estabilizar en temperatura el diodo láser.

		A414TM-B <sup>II</sup>	Para colimar el haz se utilizó una lente de 3 mm.
3	Óptica del láser	CXY1 <sup>II</sup>	Nos permite posicionar la lente en el plano perpendicular al eje óptico.
		IO-D-780-VLP <sup>II</sup>	El aislador óptico protege el diodo láser al evitar que cualquier reflejo llegue hasta la cavidad del láser.
4	Espejo	PF10-03-P01 <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma cinemática (KCB1 <sup>II</sup> ).
5	Polarizador	GTH10M <sup>II</sup>	Montado sobre una plataforma rotatoria que permite ajustar el eje de polarización (CRM1L/M <sup>II</sup> ).
6	Divisor de haz	CM1-BS2 <sup>II</sup>	Divide el haz incidente en dos, dividiendo la potencia del haz incidente al ~50 %.
7	Fotodiodo de referencia	SM05PD1A <sup>II</sup>	Conectado a un conversor I/V (PDA200C <sup>II</sup> ).
8	Sistema de medida angular de reflectancia	-	Soporte de aluminio específicamente diseñado y fabricado para emplear un prisma triangular de K9 con un ángulo de 70°.
9	Fotodiodo de medida	SM05PD1A <sup>II</sup>	Conectado a un conversor I/V (PDA200C <sup>II</sup> ).
10	Válvula de inyección	IDEX-451 <sup>III</sup>	-
11	Bomba de flujo	NE300 <sup>IV</sup>	Bomba de jeringa de flujo continuo.

<sup>I</sup> Eagleyard Photonics – <http://www.eagleyard.com/> <sup>II</sup> Thorlabs – <http://www.thorlabs.de/>

<sup>III</sup> Upchurch Scientific Inc. – <http://webstore.idex-hs.com/Products/>

<sup>IV</sup> New Era Pump Systems – <http://www.syringepump.com/>

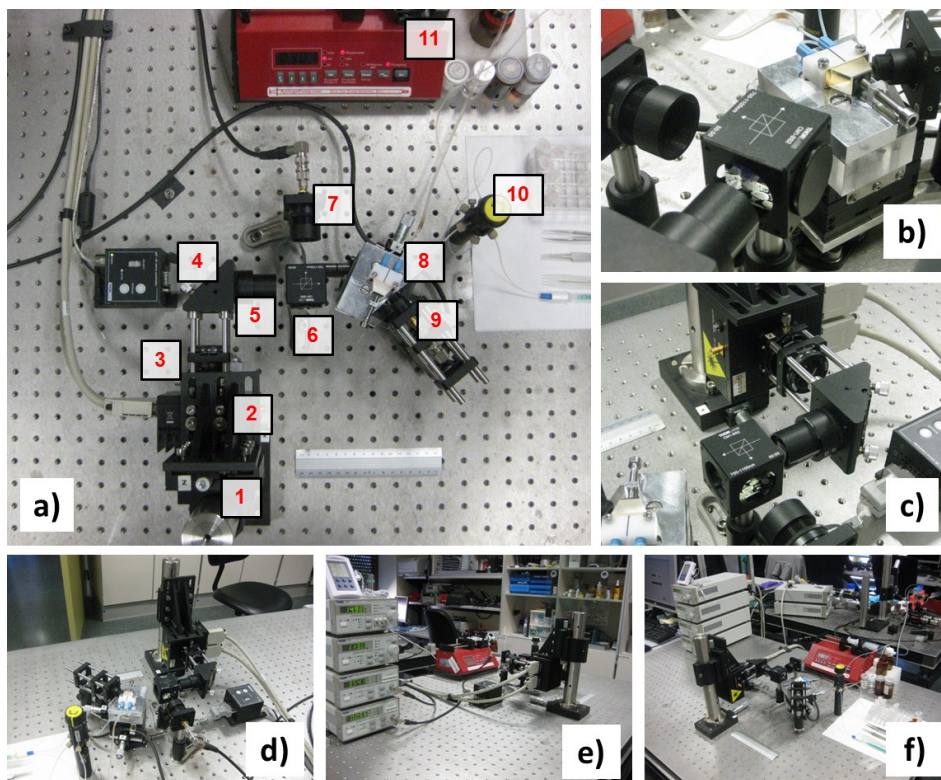


Figura 87 – Sistema experimental  $\lambda$ MSPR empleado en la caracterización y comparación realizada en esta tesis doctoral. (a) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 10. (b-c) Vista detalle del sistema experimental y (d-f)) vista general del sistema experimental empleado en el biosensor  $\lambda$ MSPR.

#### 6.5.4. Transductor. Aspectos fundamentales

Como paso previo a la caracterización del sensor  $\lambda$ MSPR, el último elemento que se debe analizar y optimizar es su transductor. Como ya se comentó, la calidad del acoplamiento entre el haz incidente y el SPP (el valor de  $R_{pp}$  en el ángulo de excitación del plasmón) determinará el valor de la pendiente de detección de la curva angular  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  y por lo tanto, influirá decisivamente en la sensibilidad del sensor. Sin embargo, además de la optimización del espesor del transductor, existen varios aspectos o elementos que deben ser analizados, como son: *el índice de refracción del prisma y del aceite de acoplamiento, la rugosidad superficial del sustrato y del transductor, y la relación entre el diámetro del haz y el tamaño de la celda.*

##### *Efecto del índice de refracción del prisma y del aceite de acoplamiento*

En el caso de depositar la lámina de Au sobre un sustrato de vidrio, este último ha de ser del mismo tipo y características que el empleado en el prisma. En caso contrario, parte de la luz será reflejada hasta el fotodetector en la interfase prisma/sustrato, generando un fondo de señal e imposibilitando que la reflectancia en el ángulo de



excitación del SPP sea próxima a cero. La Figura 88-a) muestra la curva de resonancia de dos estructuras Au/Ti de igual espesor cuando el sustrato de vidrio es de tipo BK7 o tipo K9. Como se puede apreciar, a pesar de que en teoría ambos tipos de vidrios son equivalentes, en la práctica se consigue un mejor acoplamiento con el sustrato de tipo K9 por ser este último el mismo tipo de vidrio en el que está fabricado el prisma trapezoidal. Ocurre algo similar con el aceite de acoplamiento empleado (ver Figura 42). Como muestra la Figura 88-b), si para la longitud de onda incidente, el aceite de acoplamiento no posee el mismo índice de refracción que el vidrio empleado para la fabricación del sustrato y el prisma, parte del haz será reflejado en esa interfase sin que este pueda acoplarse al SPP. En nuestro caso hemos empleado un aceite específico para el tipo de vidrio empleado (Ref. 11510 de Cargille Laboratories).

### **Efecto de la rugosidad superficial**

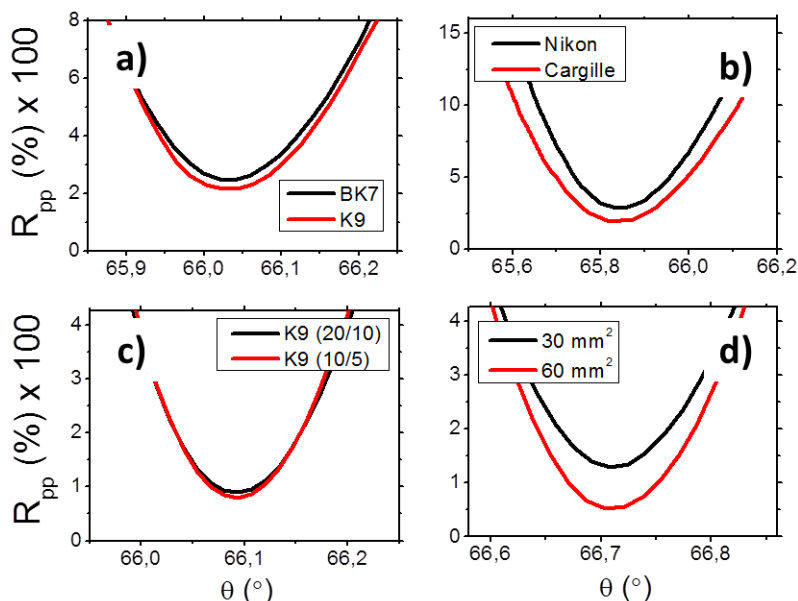
Si la superficie por la que se propaga el SPP es rugosa, esta afectará a las propiedades del SPP. En concreto, la rugosidad genera cierta dispersión en el SPP, la cual generará una componente de radiación de luz desde el SPP al medio dieléctrico y una disminución de la distancia de propagación del SPP como consecuencia del aumento de las pérdidas. Además, se producirá un ensanchamiento de la curva de resonancia. La Figura 88-c) muestra la curva de resonancia de dos estructuras Au/Ti de igual espesor crecidas sobre dos sustratos diferentes. De esta figura se desprende que con un sustrato mejor pulido (coeficiente *Scratch/Dig*<sup>26</sup> = 10/5) se alcanza un mínimo de reflectancia ligeramente menor que un sustrato con un pulido peor (coeficiente *Scratch/Dig* = 20/10), siendo además la curva angular de resonancia más estrecha en el primer caso.

### **Efecto del diámetro del haz**

Según puede observarse en la Figura 88-d), la relación entre el diámetro del haz y el tamaño de la celda posee una gran influencia. Cuando sobre la misma estructura Au/Ti inciden dos haces de distinto diámetro, aquel que posee un diámetro menor genera mínimos de reflectancia mucho más pequeños cuando se alcanza la condición de excitación del SPP. Esto se debe a que, únicamente la luz que incide dentro de la zona de la celda (en la que se encuentra el medio externo) podrá acoplarse al SPP. La luz que sea reflejada fuera de esta región no podrá acoplarse al SPP, generando con ello un aumento del valor de  $R_{pp}$  alcanzado en el ángulo de excitación del SPP. Es por esto que, en este sistema óptico, la luz residual ha de ser evitada, ya que al encontrarse el fotodetector muy cerca de la celda y no incidir la luz siempre en el mismo punto de este último, la luz residual no podrá ser fácilmente bloqueada.

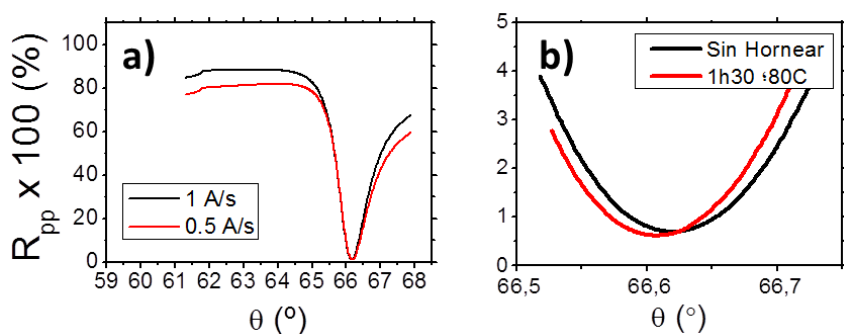
---

<sup>26</sup> Coeficiente que determina la calidad (rugosidad, nº de defectos, etc.) de una superficie transparente.



**Figura 88 – Optimización experimental de la resonancia de plasmón. Influencia de: (a) material empleado en el prisma, (b) índice de refracción del aceite de acoplamiento, (c) calidad del pulido del sustrato empleado y (d) tamaño de la celda.**

A pesar de que tras la optimización de los parámetros anteriormente descritos se ha conseguido disminuir el valor de reflectancia alcanzado en  $\theta_{spp}$ , sería conveniente conseguir minimizar aún más este valor, para así maximizar la pendiente de detección del sensor  $\lambda MSPR$ . De esta forma, continuando con la optimización experimental del transductor, se analizó la influencia de la velocidad de deposición del oro y el efecto que tenía someter a los transductores a un calentamiento controlado tras su fabricación.



**Figura 89 – Optimización experimental de la resonancia de plasmón. Influencia de la velocidad de deposición y (b) horneado de la estructura plasmónica.**

Como muestra la Figura 89-a) cuanto mayor es la velocidad de deposición más estrecha es la curva angular de resonancia y mayor es el máximo de reflectancia, ambos hechos relacionados con la disminución de la rugosidad superficial del transductor. En la Figura 89-b) se puede ver cómo al someter a un transductor a un

calentamiento controlado (1h30 a 80°C) la rugosidad superficial también experimenta una pequeña disminución (cuya consecuencia es una disminución en la absorción óptica del transductor), razón por la cual el ángulo de excitación se desplaza hacia ángulos menores y la reflectancia alcanzada en  $\theta_{spp}$  también disminuye.

Para finalizar con la optimización del transductor, comentar que (como puede observarse en la Figura 90) la disminución del espesor de la capa de Ti y por tanto, de la absorción óptica del transductor conlleva el estrechamiento, el incremento de la pendiente y del máximo de reflectancia de la curva angular de resonancia. De ahí que cuanto menor sea el espesor de la capa de adhesión empleada, mayores serán las pendientes de detección del sensor  $\lambda$ MSPR. Sin embargo, este valor está limitado por la estabilidad de los transductores. Para nuestras condiciones de deposición, se comprobó que el mínimo espesor de Ti necesario para que la adhesión entre el sustrato y una capa de unos 50 nm de Au sea óptimo, es de  $\sim 1,5$  nm.

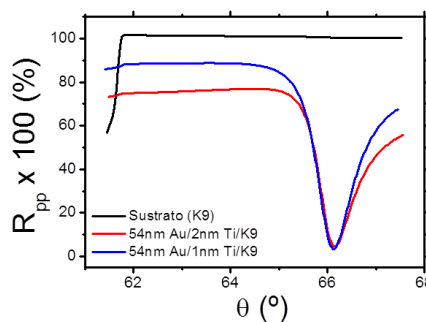


Figura 90 – Influencia del espesor de la capa de adhesión en la curva angular  $R_{pp}$ .

## 6.6. Comparativa experimental. SPR vs. $\lambda$ MSPR

De forma similar a como se realizó en el apartado 5.4 de esta tesis, se procede a caracterizar y comparar la respuesta sensora del sensor  $\lambda$ MSPR y de un sensor SPR convencional. El sistema experimental empleado en este apartado es el descrito en el apartado 6.5.3. Se empleó una frecuencia de modulación de 256 Hz, ya que se determinó experimentalmente que a esta frecuencia se obtenía la mejor relación entre la amplitud y la estabilidad-linealidad de la modulación  $\Delta\lambda$ . Como corriente de alimentación se utilizó aquella que proporcionaba la mayor amplitud de modulación  $\Delta\lambda$ ;  $I_0 + \Delta I = 120 \pm 60$  mA. Combinando todas las optimizaciones descritas en el apartado anterior, y tras ajustar de forma experimental el espesor  $d_0(Au)$  de una estructura plasmónica  $Au/1,5$  nm  $Ti/K9(10/5)$ , se obtuvo un transductor plasmónico óptimo para ambos dispositivos. Las curvas angulares y derivadas angulares de la estructura fabricada son las indicadas en la Figura 91. El espesor óptimo experimental resultó ser 51 nm, obteniéndose para esta estructura un valor  $R_{pp}(\theta_{spp}) \sim 0.8$  % y de  $(\Delta R/R)_{max} \sim 23$  %. Los valores mínimos de la derivada angular de  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  determinan los ángulos de medida del sensor SPR y el  $\lambda$ MSPR, respectivamente.

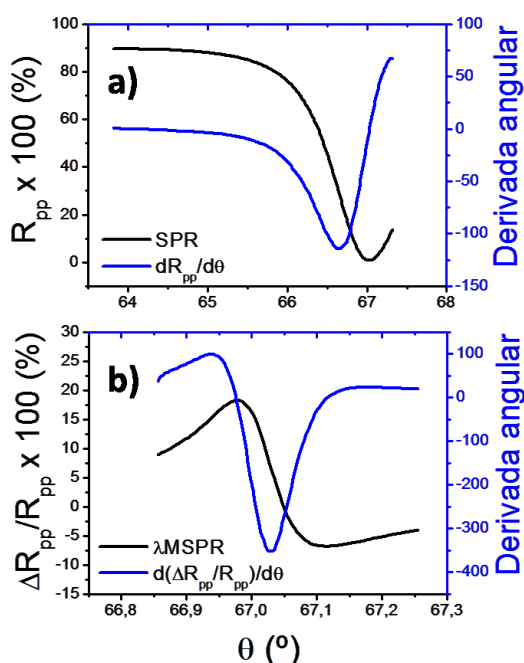


Figura 91 – Curvas angulares de (a) reflectancia y (b) variación relativa de reflectancia del transductor plasmónico empleado en la caracterización experimental del sensor  $\lambda$ MSPR. Para cada curva angular se muestra [líneas azules] su respectiva derivada angular.

La forma más sencilla de realizar una comparativa experimental directa del LOD de ambos sensores es a través de la determinación de su respuesta sensora ante los mismos cambios de índice de refracción volumétricos del medio externo ( $n_d$ ). La Figura 92 muestra la variación de señal experimentada por ambos sensores ante un  $\Delta n = 1,6 \cdot 10^{-4}$  RIU.

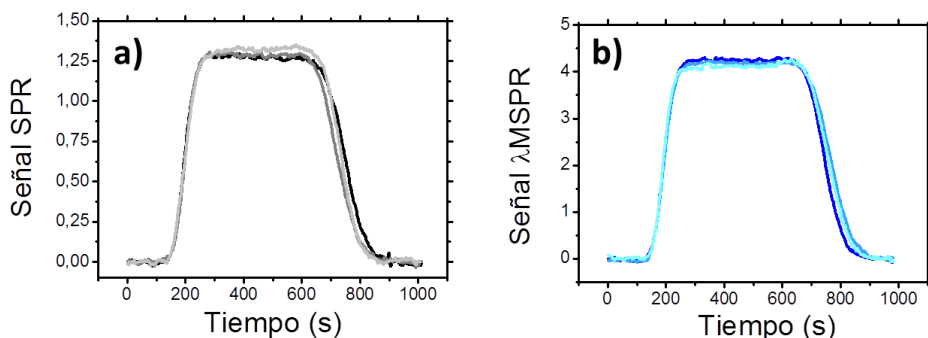
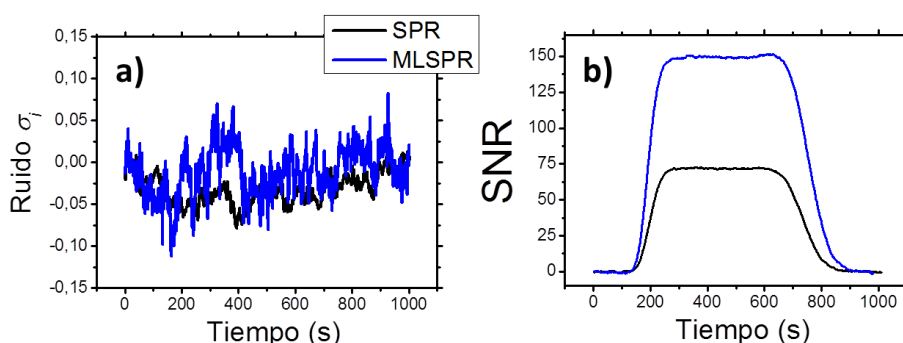


Figura 92 – Variación de señal experimentada por (a) el sensor SPR y (b) el sensor  $\lambda$ MSPR ante tres cambios de índice de refracción de  $\Delta n = 1,6 \times 10^{-4}$  RIU.

Dicha medida se realizó por triplicado, demostrando con esto que ambos sensores proporcionan medidas estables y reproducibles. Como ya se comentó, la

señal SPR se obtiene de la amplitud de la frecuencia fundamental y la señal  $\lambda$ MSPR del cociente de las amplitudes del primer armónico y la frecuencia fundamental de la FFT del cociente  $S/REF$ .

Para poder comparar ambas señales se debe determinar su respuesta sensora; es decir, su relación señal a ruido SNR. La Figura 93-a) muestra la señal experimental adquirida para ambos sensores durante 1000 s a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, cuando el medio externo  $n_d$  permanece invariante. Si se define el ruido del sistema como la desviación cuadrática media de estas señales (denominadas *señal base*), se obtiene que  $\sigma_i(\lambda MSPR) = 0.028$  y  $\sigma_i(SPR) = 0.018$ . Si, para cada sensor, se calcula el promedio de las tres variaciones de señal obtenidas para el  $\Delta n = 1,6 \cdot 10^{-4}$  RIU y este se divide por el ruido del sistema (ver Figura 93-b)), se obtiene que la respuesta sensora del sensor  $\lambda$ MSPR es el doble que la experimentada por el sensor SPR para el mismo  $\Delta n$ .



**Figura 93 – (a) Señales base con las que determinar el ruido experimental del sistema. (b) Respuesta sensora del sensor SPR y del  $\lambda$ MSPR.**

Ya que la comparativa fue realizada de forma directa, empleando el mismo sistema experimental, transductor y para el mismo buffer continuo y disolución de cambio de índice de refracción, se puede asegurar que este incremento de señal se debe únicamente a la técnica de modulación plasmónica empleada en el sensor  $\lambda$ MSPR. De este resultado también se deduce que el LOD<sup>27</sup> alcanzado en este estudio preliminar para el sensor SPR y el  $\lambda$ MSPR (con las condiciones experimentales descritas anteriormente) es, respectivamente, de  $7 \cdot 10^{-6}$  RIU y  $3 \cdot 10^{-6}$  RIU. De esta forma, los resultados preliminares demuestran el enorme potencial de este tipo de sensor. El elevado mínimo de reflectancia alcanzado en el ángulo de excitación del plasmón (0,8 % frente al límite experimental estimado de 0,01 %) impide alcanzar mejores LOD en esta configuración experimental. El hecho de no haber podido optimizar aún más el mínimo de resonancia alcanzado puede tener su explicación en una elevada rugosidad superficial del transductor ( $\sim$  varios nanómetros) o en la inadecuada colimación del haz. Ambos aspectos pueden solucionarse optimizando las condiciones de crecimiento y mejorando nuestro sistema de colimación del haz incidente. De esta forma, el primer prototipo experimental desarrollado ha revelado

<sup>27</sup> Definido como el  $\delta n$  que proporciona una variación de señal 3 veces mayor que ruido experimental del sistema (el valor de incertidumbre admitido).

que, si bien hay aspectos técnicos que complican el desarrollo de un sensor  $\lambda$ MSPR, no existe una limitación física que impida alcanzar grandes incrementos de sensibilidad respecto al sensor SPR, manteniendo además todas las cualidades que este posee. Razón por la cual, merece seguir siendo analizado y desarrollado.

## 6.7. Conclusiones

La principal conclusión de este capítulo es que la variación de la longitud de onda del haz incidente permite modular el SPP de una estructura plasmónica en configuración de Kretschmann y que, gracias a esta técnica de modulación es posible desarrollar un sensor SPR-modulado cuya respuesta sensora sea superior a la de un sensor SPR convencional. También se ha demostrado que:

- La modulación de la longitud de onda del haz incidente se puede implementar de forma sencilla con un diodo láser; para ello, bastará con aplicar una señal de alimentación sinusoidal. Sin embargo, no todos los diodos láseres responden de forma estable ante una señal de alimentación alterna.
- La optimización del acoplamiento entre el haz incidente y el SPP (es decir, la disminución del valor de  $R_{pp}(\theta = \theta_{spp})$ ) posee mayor importancia en el sensor  $\lambda$ MSPR que en el SPR. Esto se debe al hecho de que, en el caso de los dos SPR-modulados analizados durante esta tesis, la pendiente de detección viene determinada por el parámetro  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , cuyo valor se incrementa notablemente cuando  $R_{pp} \rightarrow 0$ . Debido a esto, el sensor  $\lambda$ MSPR precisa que algunos aspectos del sistema óptico de detección y del transductor sean analizados y optimizados con un mayor grado de detalle que en el caso del sensor SPR.
- La dependencia espectral de la sensibilidad del sensor  $\lambda$ MSPR está determinada por la relación entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica de la estructura plasmónica que compone el transductor.
- En el caso de emplear una estructura plasmónica formada por una lámina de 51 nm de Au, un DFB a 780 nm como fuente de luz monocromática, una  $\Delta\lambda \sim 0,25$  nm, un transductor plasmónico con  $R_{pp}(\theta = \theta_{spp}) \sim 0,8$  % y el sistema experimental descrito en el apartado 5.4, se ha demostrado que la respuesta sensora del  $\lambda$ MSPR **duplica** a la del SPR.

De esta forma, del análisis teórico/experimental del primer prototipo del sensor  $\lambda$ MSPR, se deduce que este dispositivo sensor posee un enorme potencial. Comparando los resultados obtenidos para el sensor  $\lambda$ MSPR y el MOSPR, se observa que el mínimo de reflectancia alcanzado en el transductor plasmónico del  $\lambda$ MSPR era muy elevado ( $\sim 0,8$  %) en comparación con el alcanzado en el transductor MP del MOSPR ( $\sim 0,06$  %). A pesar de que el valor de  $R_{pp}(\theta = \theta_{spp})$  era trece veces más pequeño en el sensor MOSPR, la sensibilidad de este último respecto a un sensor SPR

convencional tan sólo es dos veces mejor que la experimentada por el sensor  $\lambda$ MSPR. De este hecho se deduce que, los futuros esfuerzos han de centrarse en reducir el valor de  $R_{pp}(\theta = \theta_{spp})$  alcanzado en el transductor plasmónico. Igualmente importante sería disponer de un diodo laser convencional con una mayor (y estable) modulación de la longitud de onda de incidencia. De ahí que también sea necesario analizar y caracterizar otros tipos de diodos láseres.





# Capítulo 7

## CONCLUSIONES GENERALES

*“Sólo se puede entender la vida hacia atrás,  
pero hay que vivirla hacia delante”*  
OBSERVACIÓN DE KIERKEGAARD

---

### 7.1. Conclusiones

Las principales conclusiones derivadas del estudio teórico realizado del sensor SPR, y del análisis y desarrollo de los sensores MOSPR y  $\lambda$ MSPR, son las siguientes:

- Contrariamente a lo que cabría esperar, la sensibilidad del **sensor SPR** en configuración de Kretschmann (en cualquiera de sus configuraciones) no viene determinada exclusivamente por la dependencia del vector de ondas del MII a los cambios de índice de refracción del medio externo. La sensibilidad estará determinada por dicha dependencia, y por la anchura e intensidad de la curva de resonancia. Debido a esto, el espesor de la estructura plasmónica empleada como transductor debe ser aquel que corresponda al espesor de corte del MII excitado en configuración de Kretschmann; es decir, aquel en el que se maximiza la transferencia de energía entre la luz incidente y el plasmón superficial. En el rango visible del espectro electromagnético, y en el caso de emplear una lámina de oro como transductor plasmónico, la sensibilidad del sensor SPR se maximiza para longitudes de onda próximas al infrarrojo cercano y espesores de oro en torno a los 50 nm.
- Las estructuras magneto-plasmónicas formadas por multicapas de metales nobles y ferromagnéticos son ideales para ser empleadas como transductores

del **sensor MOSPR**. Las propiedades magneto-plasmónicas de este tipo de estructuras quedan determinadas por el espesor de la capa ferromagnética, su posición respecto a la interfase metal/dieléctrico, y por la calidad del acoplamiento entre la luz incidente y el SPP. A pesar de la compleja relación existente entre estos parámetros, el método de análisis desarrollado permite diseñar y optimizar la respuesta sensora de este tipo de estructuras magneto-plasmónicas. En el caso de estructuras de tricapa Au/Co/Au, la sensibilidad del sensor MOSPR se maximiza cuando la estructura magneto-plasmónica empleada como transductor alcanza un equilibrio entre su actividad magneto-óptica y sus propiedades plasmónicas, estando ambos parámetros controlados por los espesores de las capas que forman la estructura magneto-plasmónica. Así, tras optimizar la sensibilidad de una estructura Au/Co/Au a través de la adecuada combinación de espesores, se demostró la capacidad del sensor MOSPR para detectar analitos de bajo peso molecular, determinando además que (bajo las mismas condiciones experimentales) la respuesta sensora del sensor MOSPR con transductor optimizado era cuatro veces mayor que la obtenida en un sensor SPR convencional. Finalmente, el estudio teórico de la dependencia espectral de la sensibilidad del MOSPR demostró que, en el rango visible del espectro electromagnético, la sensibilidad del transductor Au/Co/Au aumenta progresivamente a medida que se aumenta la longitud de onda incidente.

- Gracias a la aplicación de una corriente de alimentación sinusoidal, es posible modular la longitud de onda de emisión de un diodo láser y con esta, modular el plasmón superficial. Esta novedosa y prometedora técnica de modulación plasmónica, permitió desarrollar un sensor SPR-modulado (denotado como **sensor  $\lambda$ MSPR**), cuyo primer prototipo experimental ha mostrado poseer una respuesta sensora dos veces superior a la de un sensor SPR convencional. El análisis teórico realizado de este sensor, ha revelado que la dependencia espectral de su sensibilidad está determinada por el cociente entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica de la estructura empleada como transductor, mientras que el análisis experimental ha puesto de manifiesto el hecho de que el sensor  $\lambda$ MSPR requiere que algunos aspectos del sistema óptico de detección y del transductor sean analizados y optimizados con un mayor grado detalle que en el caso del sensor SPR.

## 7.2. Perspectivas futuras

El trabajo presentado en esta memoria incrementa aún más las esperanzas depositados en los sensores SPR-modulados como alternativa futura a los actuales sensores SPR. Los valores de sensibilidad alcanzados en los dos dispositivos desarrollados, sensor MOSPR y  $\lambda$ MSPR, no representan el límite experimental alcanzable con este tipo de sensores. Por esta razón, los siguientes pasos en el estudio y desarrollo de ambos dispositivos, deben centrarse en la optimización del sistema experimental y de las propiedades físicas de los transductores empleados. En concreto:

### **Biosensor MOSPR**

Son varias las mejoras que deben aplicarse en el sistema experimental empleado como sensor MOSPR:

- En primer lugar, el aumento de la longitud de onda incidente. De esta forma, se aumentará la sensibilidad del sensor y se disminuirá el LOD alcanzado en la presente tesis.
- En segundo lugar, la sustitución del núcleo de hierro dulce del electroimán por un núcleo de ferrita. Gracias a esto, se podrá incrementar la frecuencia de modulación magneto-óptica y con ello, mejorar la relación señal a ruido del sistema experimental.
- También resultaría necesario implementar un sistema de control de temperatura que establezca térmicamente el sensor MOSPR. De esta forma, también mejorará la relación señal a ruido del sistema al disminuir el ruido experimental. Debido a que el sensor MOSPR posee una mayor sensibilidad a los cambios de índice de refracción del medio externo, también se verá más afectado por la temperatura que el sensor SPR. Por esta razón, la termo-estabilización del sistema experimental aumentará aún más el incremento de sensibilidad observado en el sensor MOSPR.

Gracias al método de diseño de transductores magneto-plasmónicos desarrollado, disponemos de una herramienta que nos permite optimizar cualquier estructura magneto-plasmónica con sólo conocer sus constantes dieléctricas (ópticas y magneto-ópticas). De esta manera, se está en condiciones de analizar nuevas estructuras o materiales magneto-plasmónicos. Es por esto que resultaría muy interesante:

- Caracterizar las propiedades ópticas y magneto-ópticas de distintas aleaciones de metales ferromagnéticos (CoFe, CoNi, etc) o de combinaciones de multicapas Au/Ag/CoAg [170], en busca de estructuras magneto-plasmónicas con mejores propiedades que las exhibidas por las multicapas Au/Co/Au.
- Emplear técnicas y condiciones de crecimiento que permitan la creación de estructuras epitaxiales de metales nobles y ferromagnéticos, ya que se ha demostrado que esto mejora las propiedades plasmónicas y magneto-ópticas de las estructuras magneto-plasmónicas formadas por multicapas de metales nobles y ferromagnéticos [171].

**Biosensor  $\lambda$ MSPR**

Del análisis teórico y experimental del sistema experimental desarrollado se deduce que hay varios aspectos claves a mejorar:

- En primer lugar, y por los mismos motivos argumentados en el caso del sensor MOSPR, será necesario implementar un sistema de control de temperatura.
- 
- También sería necesario modificar la longitud de onda central incidente. Ya que cuanto más estrecha es la curva de  $R_{pp}$  más difícil es observar de forma experimental mínimos de reflectancia próximos a cero, y que la sensibilidad del sensor  $\lambda$ MSPR permanece aproximadamente constante entre 720 y 800 nm, resultaría conveniente reducir la  $\lambda_0$  empleada en el sensor  $\lambda$ MSPR hasta los 720 nm, para así disponer de curvas de resonancia más anchas que faciliten la obtención de mínimos de resonancia lo más próximo posibles a cero.
- Además de reducir la  $\lambda_0$ , el incremento de  $\Delta\lambda$  también mejoraría (de forma proporcional) la sensibilidad del sensor  $\lambda$ MSPR. Esto obligaría a analizar, de forma experimental, la capacidad de modulación de diferentes diodos láseres, en búsqueda de una fuente de luz con mayor estabilidad y  $\Delta\lambda$  que la mostrada por el DFB (modelo EYP-DFB-780 de la marca EagleYard).

En el caso del sensor  $\lambda$ MSPR, el trabajo de mejora de las propiedades físicas del transductor debe centrarse en la disminución de la rugosidad superficial y de la absorción óptica de la estructura empleada como transductor. Para ello, habrá que evaluar diferentes técnicas y condiciones de evaporación de las capas metálicas, posibles pre/post-tratamientos de fabricación de las estructuras plasmónicas, utilización de aleaciones AuAg o multicapas Au/Ag, eliminación o sustitución de la capa de adhesión de Ti por alguna otra capa con mejores propiedades plasmónicas, etc.

# APÉNDICES

## A. CONSTANTES DIELECTRICAS

- Metales nobles y seminobles

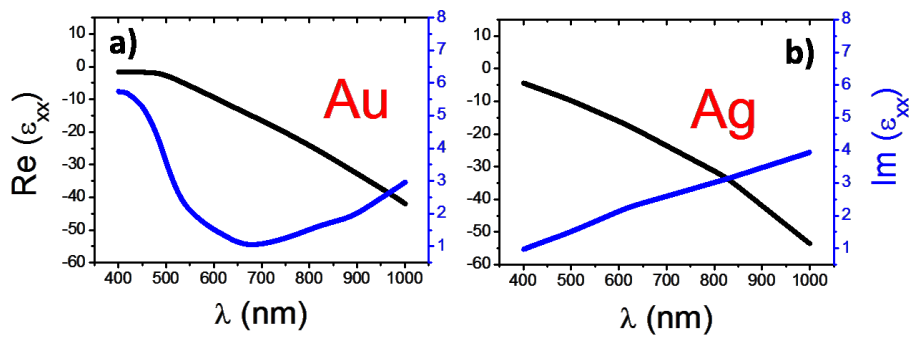


Figura A. 1– Constante dieléctrica de: (a) oro (Fuente: Jonhson [172]) y (b) plata (Fuente: Palik [173]).

- Materiales de adhesión

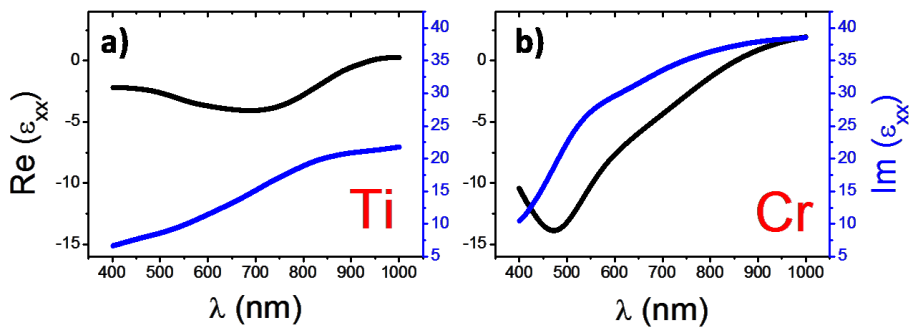


Figura A. 2– Constante dieléctrica de: (a) titanio y (b) cromo (Fuente: Johnson [172]).

- Metales ferromagnéticos

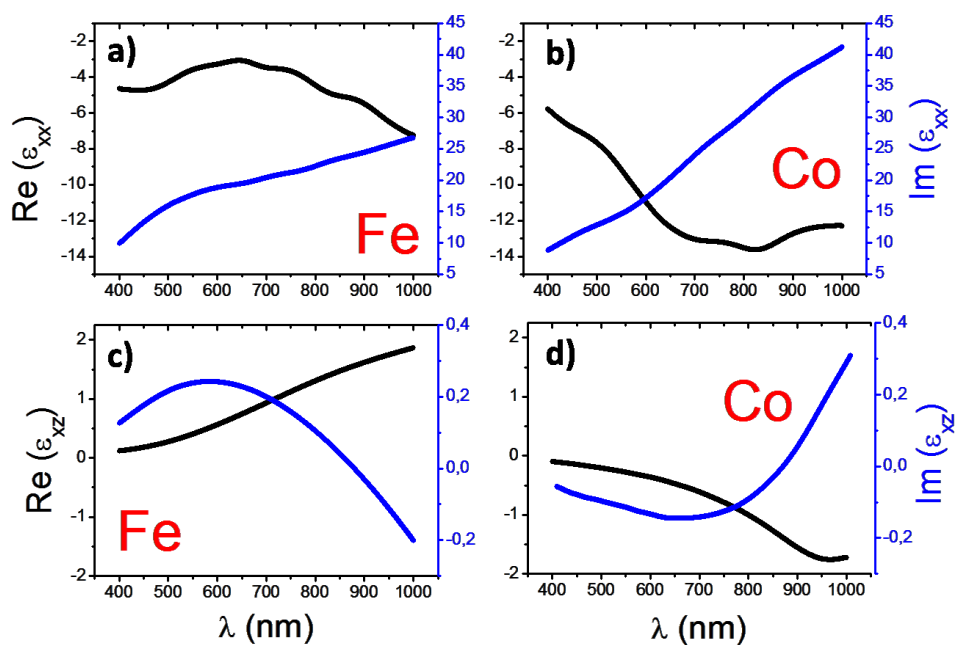


Figura A.3 – Constante dieléctrica del hierro y del cobalto: (a y b) ópticas y (c y d) magneto-ópticas (Fuente: Lee [174]).

- Constantes dieléctricas del Au y el Co empleadas en las simulaciones del apartado 5.3.2 de esta memoria

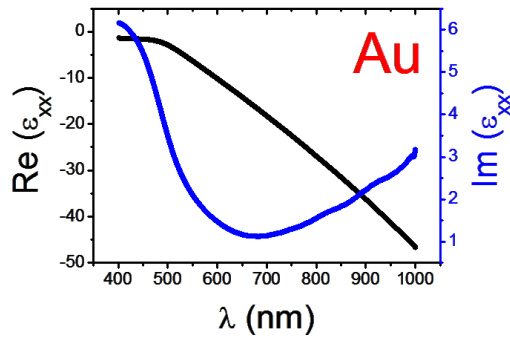


Figura A.4 – Constante dieléctrica experimental del oro determinada por elipsometría en el IMM-CNM (CSIC).

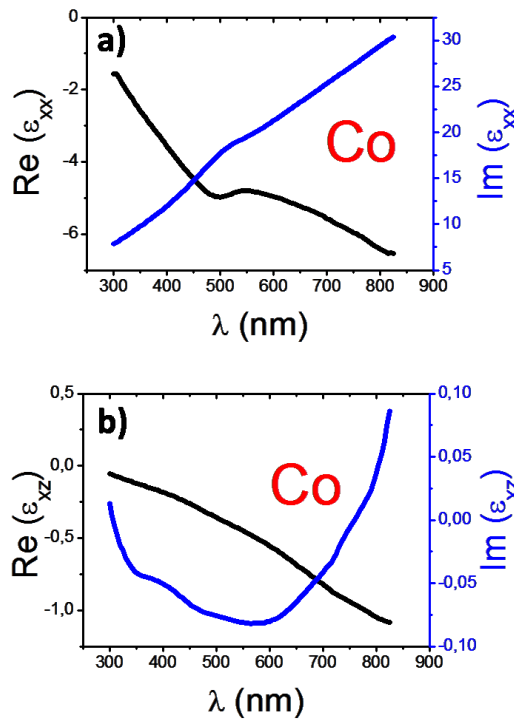


Figura A.5 – Constantes dieléctricas experimentales del cobalto determinadas por elipsometría en el IMM-CNM (CSIC): (a) ópticas y (b) magneto-ópticas.





## B. MÉTODO DE MATRICES DE TRANSFERENCIA

El Método de Matrices de Transferencia (abreviado como MMT) es un método muy empleado en óptica a la hora de determinar la propagación de campos electromagnéticos en estructuras de multicapas. El MMT considera el sistema de multicapas como la superposición lineal (y ordenada) de las diferentes capas que lo componen, permitiendo así determinar sus propiedades ópticas y magneto-ópticas.

Considérese la situación en la que sobre una monocapa de espesor  $d$  e índice de refracción  $n_i$  se hace incidir una onda plana  $A$  a un ángulo  $\theta_i$ . Dicha onda estará caracterizada por un vector de ondas  $\vec{k}_A$  y poseerá amplitudes complejas  $A_p$  y  $A_s$  para las componentes  $p$  y  $s$  de polarización, respectivamente. En general, como se indica en la Figura B. 1-a), la onda incidente será parcialmente reflejada y transmitida a otro medio con índice de refracción  $n_f$ , siendo  $B_p$ ,  $B_s$ ,  $C_p$  y  $C_s$  las amplitudes complejas de la onda reflejada y transmitida.

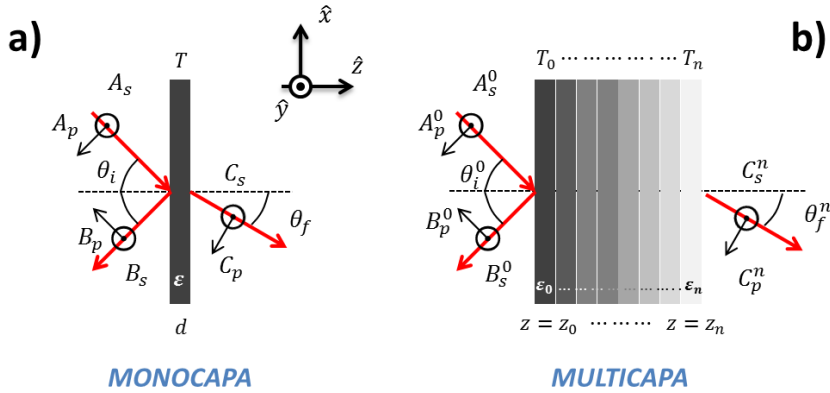


Figura B. 1 – Representación esquemática de (a) una monocapa de espesor  $d$  y tensor dieléctrico  $\epsilon$  y (b) de un sistema de multicapas formada por un número arbitrario  $n$  de capas de espesor  $d_n$  y tensor dieléctrico  $\epsilon_n$ . Las ondas incidente, reflejada y transmitida están caracterizadas por su vector de ondas, su ángulo y por las componentes de polarización  $p$  y  $s$ .

Para poder conectar las amplitudes incidentes y reflejadas con las transmitidas, se define una Matriz de Transferencia 4x4 (denotada como  $\mathbb{T}$ ) de la forma[175]:

$$\begin{pmatrix} A_s \\ B_s \\ A_p \\ B_p \end{pmatrix} = \mathbb{T} \cdot \begin{pmatrix} C_s \\ 0 \\ C_p \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T_{11} & T_{12} & T_{13} & T_{14} \\ T_{21} & T_{22} & T_{23} & T_{24} \\ T_{31} & T_{32} & T_{33} & T_{34} \\ T_{41} & T_{42} & T_{43} & T_{44} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} C_s \\ 0 \\ C_p \\ 0 \end{pmatrix} \quad (68)$$

Para el caso particular de una monocapa, la matriz  $\mathbb{T}$  será el producto de la denominada *Matriz incidente*  $\mathcal{L}_i$  y de la *Matriz final*  $\mathcal{L}_f$ , así como de la *Matriz de Transferencia Parcial* de la monocapa  $T$ :

$$\mathbb{T} = (\mathcal{L}_i)^{-1} \cdot T \cdot \mathcal{L}_f \quad (69)$$

siendo  $\mathcal{L}_i$  la proyección de las amplitudes del campo eléctrico y magnético de la onda incidente/reflejada en la primera interfase, y  $\mathcal{L}_f$  la proyección de las amplitudes del campo eléctrico y magnético de la onda transmitida sobre la última interfase. De esta forma, asumiendo el sistema de referencia y geometría descritas en la Figura B. 1-a), se tendrá que:

$$(\mathcal{L}_i)^{-1} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & -n_i^{-1} \cdot \cos^{-1} \theta_i & 0 \\ 0 & 1 & n_i^{-1} \cdot \cos^{-1} \theta_i & 0 \\ \cos^{-1} \theta_i & 0 & 0 & n_i^{-1} \\ -\cos^{-1} \theta_i & 0 & 0 & n_i^{-1} \end{pmatrix} \quad (70-a)$$

$$\mathcal{L}_f = \begin{pmatrix} 0 & 0 & \cos \theta_f & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ -n_f \cdot \cos \theta_f & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & n_f & 0 \end{pmatrix} \quad (70-b)$$

Dependiendo de la naturaleza del medio que forma la monocapa, la *Matriz de Transferencia Parcial*  $T$  de la monocapa será diferente. Así, en el caso de medios isótropos y no magnéticos, la *Matriz de Transferencia Parcial* de la monocapa será de la forma:

$$T = \begin{pmatrix} \cos(k_0 \cdot d \cdot q) & 0 & 0 & i \cdot q / \varepsilon \cdot \sin(k_0 \cdot d \cdot q) \\ 0 & \cos(k_0 \cdot d \cdot q) & -i / \varepsilon \cdot \sin(k_0 \cdot d \cdot q) & 0 \\ 0 & -i \cdot q \cdot \sin(k_0 \cdot d \cdot q) & \cos(k_0 \cdot d \cdot q) & 0 \\ i \cdot \varepsilon / q \cdot \sin(k_0 \cdot d \cdot q) & 0 & 0 & \cos(k_0 \cdot d \cdot q) \end{pmatrix} \quad (71)$$

siendo  $n$  el índice de refracción de la monocapa ( $\varepsilon = n^2$ ),  $k_0 = \omega/c$  y  $q = \sqrt{n^2 - n_i^2 \cdot \sin^2 \theta_i}$ .

En el caso de medios magnéticos o biaxiales, la *Matriz de Transferencia Parcial* de la monocapa será algo más compleja. En este caso:

$$T = \beta_0 \cdot \mathbb{I} + \beta_1 \cdot \Delta + \beta_2 \cdot \Delta^2 + \beta_3 \cdot \Delta^3 \quad (72)$$

siendo  $\mathbb{I}$  la matriz identidad,  $\Delta$  un tensor función de  $\varepsilon$  y de la componente  $\hat{x}$  del vector de ondas  $\vec{k}_A$  ( $k_x = n_i \cdot \sin \theta_i$ ) y  $\beta_i$  unos escalares cuyo valor debe cumplir la relación:

$$\exp\{i \cdot \omega / c \cdot q_k \cdot d\} = \sum_{j=0}^3 \beta_j \cdot q_k^j ; \quad k = 1, \dots, 4 \quad (73)$$

siendo  $q_k$  los autovalores del tensor  $\Delta$  definido como:

$$\Delta = \begin{pmatrix} k_x \cdot \varepsilon_{xz} / \varepsilon_{zz} & 0 & 0 & 1 - k_x^2 / \varepsilon_{zz} \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ \varepsilon_{xy} & k_x^2 - \varepsilon_{xx} & 0 & 0 \\ \varepsilon_{xx} + \varepsilon_{xz}^2 / \varepsilon_{zz} & \varepsilon_{xy} & 0 & -k_x \cdot \varepsilon_{xz} / \varepsilon_{zz} \end{pmatrix} \quad (74)$$

Considérese ahora la situación descrita en la Figura B. 1-b), esto es, un sistema de multicapas formado por  $n$  capas plano-paralelas cada una de ellas con un tensor dieléctrico  $\varepsilon_n$  y un espesor  $d_n = z_n - z_{n-1}$ . En esta situación la *Matriz de Transferencia Total*  $\mathbb{T}$  del sistema se podrá obtener a partir del producto de las  $n$  *Matrices de Transferencia parciales*  $T_n$  y de las *Matrices incidente y final* descritas en la ecuación ( 70 ). Así, una vez conocidas todas las matrices que describen la propagación de la luz a través de cada capa, la *Matriz de Transferencia Total*  $\mathbb{T}$  del sistema permitirá conectar las amplitudes complejas de la luz incidente ( $A_s^0$  y  $A_p^0$ ) y reflejada ( $B_s^0$  y  $B_p^0$ ), con las de la luz transmitida ( $C_s^n$  y  $C_p^n$ ). Esto es:

$$\begin{pmatrix} A_s^0 \\ B_s^0 \\ A_p^0 \\ B_p^0 \end{pmatrix} = \mathbb{T} \cdot \begin{pmatrix} C_s^n \\ 0 \\ C_p^n \\ 0 \end{pmatrix} = (\mathcal{L}_i)^{-1} \cdot \left[ \prod_{j=0}^n T_n(d_n) \right] \cdot \mathcal{L}_f \cdot \begin{pmatrix} C_s^n \\ 0 \\ C_p^n \\ 0 \end{pmatrix} \quad (75)$$

donde las *Matrices parciales* de los medios magnéticos estarán definidas por la ecuación ( 72 ), mientras que las de los medios no-magnéticas serán de la forma indicadas por la ecuación ( 71 ).

Finalmente, los coeficientes de reflexión y transmisión, los cuales definen el comportamiento óptico y magneto-óptico del sistema de multicapas, pueden expresarse en términos de los elementos de la matriz de transferencia total  $\mathbb{T}$ . Así, por ejemplo, el coeficiente de reflexión de la luz  $p$ -polarizada será el indicado por la ecuación ( 76 ):

$$r_{pp} = \left( \frac{B_p^0}{A_p^0} \right)_{A_p^0=0} = \frac{T_{11} \cdot T_{43} - T_{41} \cdot T_{31}}{T_{11} \cdot T_{33} - T_{13} \cdot T_{31}} \quad (76)$$

siendo la reflectancia de la componente  $p$ -polarizada  $R_{pp} = |r_{pp}|^2$ .

El término  $r_{pp}$  será función de la longitud de onda y del ángulo de incidencia, así como de los espesores y la permitividad dieléctrica de cada capa. De esta forma, el MMT proporciona un sencillo pero potente método de análisis de las propiedades y la dependencia estas con los parámetros indicados, para cualquier transductor plasmónico o MP formado por un sistema de multicapas.



### C. EJEMPLO DE SENSOGRAMA DEL BIOSENSOR SPR

A modo de ejemplo de la aplicabilidad como biosensor del dispositivo SPR se muestra la detección directa de un anticuerpo específico (analito) a una proteína covalentemente inmovilizada sobre la superficie sensora. En concreto, la Figura C. 1-a) muestra el sensograma del proceso completo de inmovilización de la proteína (la albúmina bovina, BSA), mientras que en la Figura C. 1-b) se puede observar la detección del anticuerpo específico a la proteína inmovilizada, el Anti-BSA, y la posterior regeneración de la superficie. Después de cada uno de los procesos indicados en el sensograma, se determina la curva de resonancia angular y su correspondiente derivada angular. De esta forma, al determinar y reposicionar el ángulo de medida al inicio de cada uno de esos pasos, el biosensor SPR de intensidad se encontrará fijado al ángulo de máxima pendiente de  $R_{pp}$ , garantizando con esto que la respuesta del SPR es máxima en cada una de las interacciones. En el caso de la detección del analito, al ser la variación angular de la curva de resonancia muy pequeña, no será necesario volver a posicionar el ángulo de medida. La variación de señal asignada a cada proceso (la que permitirá determinar la concentración de material depositado sobre la superficie sensora) será la diferencia entre su valor inicial y su valor final.

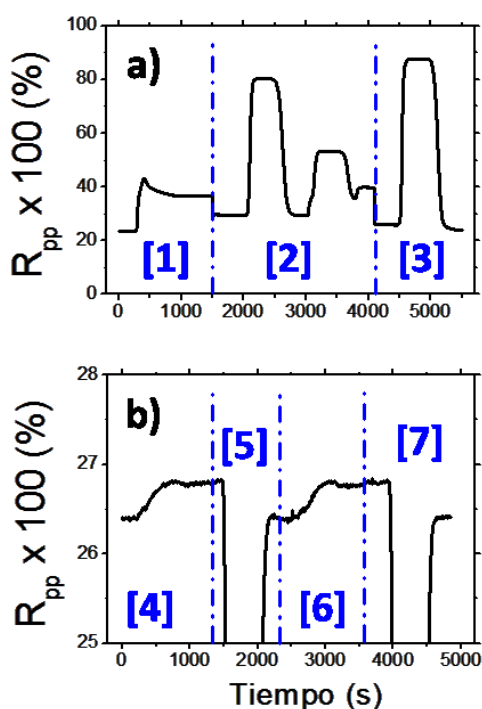


Figura C. 1 – Ejemplo de aplicación biosensora: (a) sensograma de la inmovilización de BSA mediante enlace covalente (procesos [1] a [3]) y (b) sensograma de la detección de la unión BSA-antiBSA (procesos [4] y [6]) y su posterior desunión o regeneración (procesos [5] y [7]).

En la Tabla 11 se detallan las condiciones empleadas en este bioensayo. Resumiendo, la Figura C. 1-a) muestra la respuesta del SPR ante: [1] la formación de la monocapa autoensamblada (SAM), [2] la activación del grupo funcional en el que termina la SAM y la posterior inmovilización del bioreceptor y finalmente, [3] el bloqueo de la superficie sensora (de los grupos funcionales activados no ocupados por bioreceptores). En el sensograma de la Figura C. 1-b) se puede ver la respuesta sensora del SPR al analito [4 y 6] y la regeneración de la superficie sensora [5 y 7]. Gracias a la regeneración de la superficie (es decir, a la desunión del analito-bioreceptor) la superficie sensora puede ser reutilizada. Esta es una de las cualidades más importantes que puede tener un biosensor. Gracias a ella no sólo se reduce el coste del análisis, si no que se minimiza el tiempo de análisis al no tener que realizar el protocolo de inmovilización en cada detección. Además permite realizar réplicas de cada detección, aumentando así el nivel de confianza de los resultados.

**Tabla 11 – Protocolo empleado en el ejemplo de aplicación biosensora del SPR.**

[Nº]	Etapas	Condiciones
1.	Formación de la SAM	Se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de SH-PEG <sub>5000</sub> -CO <sub>2</sub> H ( 0,5 mg/ml ) preparados en agua desionizada, generándose un fuerte enlace entre el grupo tiol (-SH) y los átomos de oro.
2.	Inmovilización del bioreceptor	<i>Activación del grupo funcional</i> -CO <sub>2</sub> H: se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de una mezcla 1: 1 de EDC (0.2 M) y NHS (0.05M) preparada en agua desionizada.  <i>Inmovilización del receptor</i> (BSA): se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de BSA (60 $\mu\text{g/ml}$ ) preparada en agua desionizada.
3.	Bloqueo de la superficie	Se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de etanolamina (1 M, pH 8) preparados en agua desionizada. Al bloquear la superficie se minimizarán los enlaces inespecíficos.
4. y 6.	Interacción inmunológica BSA-AntiBSA	Se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de Anti-BSA (2 $\mu\text{g/ml}$ ) preparada en buffer PBS.
5. y 7.	Regeneración superficial	Se inyectan 300 $\mu\text{l}$ de HCl (20 mM).

- Durante la inmovilización (Figura C. 1-a)) se empleó agua desionizada como *buffer* continuo, mientras que durante la detección (Figura C. 1-b)) se empleó un *buffer* PBS.

- En todo el proceso la velocidad de flujo empleada fue de 20  $\mu\text{l/min}$  y se trabajó a temperatura ambiente.

En la Figura C. 2 se muestra el desplazamiento angular experimentado por la curva de resonancia durante el proceso de modificación de la superficie (a) y en el proceso de inmovilización de la BSA (b). Las Figura C. 2-c) y d) muestran como efectivamente, la mayor variación de reflectancia se produce en el ángulo de máxima pendiente angular. Sin embargo, esta afirmación pierde validez para grandes desplazamientos de la curva de resonancia. Comparando estas figuras se aprecia cómo en el caso de la Figura C. 2-c) existe una pequeña variación angular entre el ángulo de máxima  $\delta R_{pp}$  y el de máxima derivada de  $R_{pp}$ . Y es que para grandes desplazamientos, como muestra la Figura C. 2-a), las curvas anterior y posterior a una interacción dejan de ser paralelas y por lo tanto, el ángulo de máxima  $\delta R_{pp}$  comienza a desplazarse hacia el ángulo de excitación del SPP.

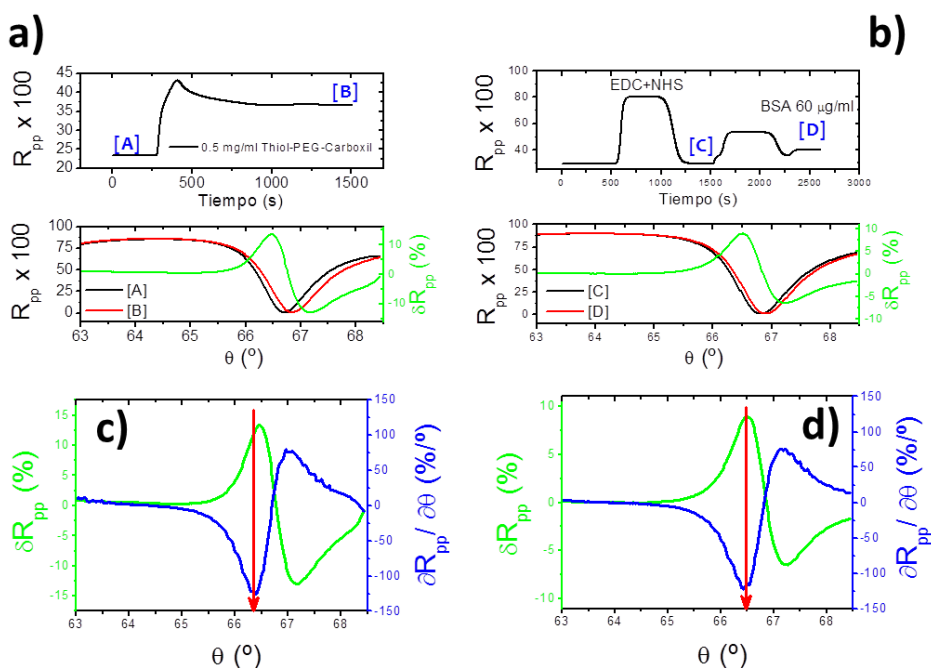


Figura C. 2 – Detalle de los procesos [1] y [2]. (a) y (b) curvas angulares del desplazamiento generado durante la creación de la SAM y la inmovilización del receptor, respectivamente. (c) y (d) Comparativa entre la derivada de  $R_{pp}$  y la curva angular de desplazamiento producida tras la creación de la SAM y la inmovilización del receptor, respectivamente.





# SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS PRINCIPALES

LOD – Límite de detección.

SNR – Relación señal-a-ruido.

$\sigma_i$  – Ruido del sistema  $i$ .

MMT – Método de Matrices de Transferencia.

SPR – Resonancia de Plasmón Superficial.

SPP – Plasmón-Polaritón Superficial.

$\epsilon$  – Tensor permitividad eléctrica.

$\epsilon$  – Constante dieléctrica.

$\epsilon'$  – Parte real de la constante eléctrica.

$\epsilon''$  – Parte imaginaria de la constante eléctrica.

$n$  – Índice de refracción.  $\epsilon = n^2$ .

$\phi_i^{TE,TM}$  – Salto de fase de Fresnel producidos en una discontinuidad  $i$  en el caso de luz incidente con polarización TE y TM.

TE – Modo de polarización Transversal Eléctrico (o  $s$ -polarizado).

TM – Modo de polarización Transversal Magnético (o  $p$ -polarizado).

$\epsilon_m$  – Constante dieléctrica del medio metálico.

$\epsilon_d$  – Constante dieléctrica del medio dieléctrico.

$k_{spp}$  – Vector de ondas o constante de propagación del SPP.

$k'_{spp}$  – Parte real del vector de ondas del SPP.

$k''_{spp}$  – Parte imaginaria del vector de ondas del SPP.

$\gamma_m$  – Constante de decaimiento transversal en el metal.

$\gamma_d$  – Constante de decaimiento transversal en el dieléctrico.

$L_m$  – Distancia de penetración del campo electromagnético en el metal.

$L_d$  – Distancia de penetración del campo electromagnético en el dieléctrico.

$L_{spp}$  – Distancia de propagación del SPP.

$k_z^{luz}$  – Componente  $\hat{z}$  (paralela a la interfase metal/dieléctrico) del vector de ondas de la luz incidente.

$\theta$  – Ángulo de incidencia.

$\lambda, \omega$  – Longitud de onda y frecuencia de la luz incidente.

$\varepsilon_p$  – Constante dieléctrica del prisma de acoplamiento.

$\theta_{spp}$  – Ángulo de excitación del SPP en una interfase  $\varepsilon_m/\varepsilon_d$ .

$\lambda_{spp}$  – Longitud de onda de excitación del SPP en una interfase  $\varepsilon_m/\varepsilon_d$ .

$R_{pp}$  – Reflectancia de la componente de luz  $p$ -polarizada.

$\delta\varepsilon$  ( $\delta n$ ) – Variación de la constante dieléctrica (índice de refracción) del medio externo.

$\bar{\varepsilon}$  – Constante dieléctrica del medio externo tras la variación  $\delta\varepsilon$ .  $\bar{\varepsilon} = \varepsilon + \delta\varepsilon$

$\delta k_{spp}$  – Variación del vector de ondas del SPP como consecuencia de  $\delta\varepsilon$ .

$\delta\theta_{spp}$  – Variación del ángulo de excitación del SPP como consecuencia de  $\delta\varepsilon$ .

$\delta\lambda_{spp}$  – Variación de la longitud de onda de excitación del SPP como consecuencia de  $\delta\varepsilon$ .

$\bar{k}_{spp}$  – Vector de ondas del SPP tras la variación  $\delta\varepsilon$ .  $\bar{k}_{spp} = k_{spp} + \delta k_{spp}$ .

$\bar{\theta}_{spp}$  – Ángulo de excitación del SPP en una interfase  $\varepsilon_m/\bar{\varepsilon}_d$ .  
 $\bar{\theta}_{spp} = \theta_{spp} + \delta\theta_{spp}$ .

$\bar{\lambda}_{spp}$  – Longitud de onda de excitación del SPP en una interfase  $\varepsilon_m/\bar{\varepsilon}_d$ .  
 $\bar{\lambda}_{spp} = \lambda_{spp} + \delta\lambda_{spp}$ .

$\delta R_{pp}$  – Variación de la reflectancia de la componente de luz  $p$ -polarizada como consecuencia de  $\delta\varepsilon$ . Señal del biosensor SPR de intensidad.

$\theta_{SPR}$  – Ángulo de medida del biosensor SPR-angular y de intensidad.

$\lambda_{SPR}$  – Longitud de onda de medida del biosensor SPR-espectral.

$d_{Au}$  – Espesor de la capa de oro empleada como transductor del biosensor SPR y del  $\lambda$ MSPR.

$\delta\mathcal{S}$  – Variación de señal registrada en el biosensor SPR en configuración  $i$  ante un cambio  $\delta n$  en el medio externo.

$\eta_{SPR}^i$  – Sensibilidad del biosensor SPR en configuración  $i$ .  $\eta_{SPR}^i = \delta\mathcal{S}/\delta n$ .

$\eta_{SPR}^i$  – Respuesta sensora del biosensor SPR en configuración  $i$ .  $\eta_{SPR}^i = \mathcal{S}_{SPR}^i/\sigma_i$ .

$\Delta\varepsilon$  ( $\Delta n$ ) – Alteración controlada de la constante dieléctrica (índice de refracción) del metal.

$\hat{\varepsilon}$  – Constante dieléctrica del metal tras alterar su valor un cantidad  $\Delta\varepsilon$ .  
 $\hat{\varepsilon} = \varepsilon_m + \Delta\varepsilon$ .

$\Delta k_{spp}$  – Alteración controlada del vector de ondas del SPP como consecuencia de  $\Delta\varepsilon$ .

$\Delta\theta_{spp}$  – Alteración controlada de  $\theta_{spp}$  como consecuencia de  $\Delta\varepsilon$ .

$\Delta\lambda_{spp}$  – Alteración controlada de  $\lambda_{spp}$  como consecuencia de  $\Delta\varepsilon$ .

$\hat{k}_{spp}$  – Vector de ondas del SPP tras alterar la constante dieléctrica del metal una cantidad  $\Delta\varepsilon$ .  $\hat{k}_{spp} = k_{spp} + \Delta k_{spp}$ .

$\hat{\theta}_{spp}$  – Ángulo de excitación del SPP en una interfase  $\hat{\varepsilon}/\varepsilon_d$ .  
 $\hat{\theta}_{spp} = \theta_{spp} + \delta\theta_{spp}$ .

$\hat{\lambda}_{spp}$  – Longitud de onda de excitación del SPP en una interfase  $\hat{\varepsilon}/\varepsilon_d$ .  
 $\hat{\lambda}_{spp} = \lambda_{spp} + \delta\lambda_{spp}$ .

MOSPR – Resonancia de Plasmón Superficial magneto-ópticamente modulada.

TMOKE – Efecto Kerr Transversal Magneto-Óptico.

MO – Magneto-óptico/a.

MP – Magneto-plasmónico/a.

$\Delta R_{pp}$  – Variación de  $R_{pp}$  como consecuencia de la alteración controlada  $\Delta\varepsilon$  de la constante dieléctrica del metal.

$\Delta R_{pp}/R_{pp}$  – Variación relativa de  $R_{pp}$  como consecuencia de la alteración controlada  $\Delta\varepsilon$  de la constante dieléctrica del metal.

$\delta(\Delta R_{pp}/R_{pp})$  – Variación de la señal de respuesta de un biosensor SPR-modulado fruto de un  $\delta n$  en el medio externo.

$M_y$  – Componente de *Imanación* en la dirección  $\hat{y}$  (es decir, paralela a la superficie de la capa magnética).

$M_{sat}$  – Valor de saturación de la *Imanación* de una capa ferromagnética.

$\Delta\theta_{MO}$  – Alteración controlada de  $\theta_{spp}$  como consecuencia de la modulación magneto-óptica del SPP.

$\varepsilon_{ij}$  – Componente  $ij$  del tensor permitividad eléctrica.

$d_{Autop}$  – Espesor de la capa superior de oro (la que está en contacto con el medio externo).

$d_{Fe}$  y  $d_{Co}$  – Espesor de la capa ferromagnética de hierro y cobalto, respectivamente.

$d_{Aubottom}$  – Espesor de la capa inferior de oro (la que está en contacto con el prisma).

$R_{min}$  – Valor de la reflectancia angular de la componente p-polarizada en el ángulo de excitación  $R_{pp}(\theta = \theta_{spp})$ .

$(\Delta R/R)_{max}$  – Diferencia entre el valor máximo y mínimo de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  de la curva angular.

$\eta_{MOSPR}$  – Sensibilidad del biosensor MOSPR.

$$\eta_{MOSPR} = \delta(\Delta R_{pp})/\delta n \text{ evaluada en } \theta = \theta_{spp}.$$

$\lambda\text{MSPR}$  – Resonancia de Plasmón Superficial modulada en  $\lambda$ .

$S$  – Señal del sensor.

$REF$  – Señal de referencia.

$I = I_0 + \Delta I \cdot \sin(\omega \cdot t)$  – Corriente de inyección (o alimentación) sinusoidal aplicada al diodo láser.  $I_0$  corriente central de alimentación,  $\Delta I$  amplitud de la corriente de modulación y  $\omega$  frecuencia de modulación.

$\lambda_0$  – Longitud de onda central de emisión correspondiente a la corriente central de alimentación.

$\Delta\lambda$  – Alteración controlada de la longitud de onda incidente generada por una corriente de alimentación alterna.

AA – Anchura de la curva angular de  $R_{pp}$ , determinada para  $R_{pp} = 5 \%$ .

$\partial(\Delta R_{pp})/\partial\theta$  – Valor de la derivada angular de  $\Delta R_{pp}$  en el ángulo de excitación del SPP.

$max \Delta R_{pp}$  – Máximo valor de  $\Delta R_{pp}$ .

y la variación angular de  $\theta_{spp}$  debida a la modulación  $\Delta\lambda$  (denotado como  $\Delta\theta_\lambda$

$\Delta\theta_\lambda$  – Variación angular de  $\theta_{spp}$  debida a la modulación  $\Delta\lambda$ .

$\eta_{\lambda\text{MSPR}}$  – Sensibilidad del biosensor  $\lambda\text{MSPR}$ .

$$\eta_{\lambda\text{MSPR}} = \delta(\Delta R_{pp})/\delta n \text{ evaluada en } \theta = \theta_{spp}.$$

# LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Esquema básico de funcionamiento de un biosensor.</i>	6
<i>Figura 2 – Clasificación de los tipos de biosensores ópticos: (a) bio-optrodo y (b) de campo evanescente. Dentro de estos últimos destacan los basados en guías planas y en plasmones superficiales.</i>	13
<i>Figura 3 – Diferentes tipos de plasmones superficiales: (a) propagantes [SPP] y (b) localizados [LSPP].</i>	17
<i>Figura 4 – Guía de onda plana con perfil de salto de índice. (a) Esquema tridimensional de la guía y (b) su correspondiente perfil de índice de refracción.</i>	18
<i>Figura 5 – Geometría de una guía plasmónica formada por la interfase entre un medio dieléctrico y un metal.</i>	22
<i>Figura 6 – Dependencia espectral del valor de la parte real e imaginaria del vector de ondas del SPP en una interfase Au/dieléctrico con <math>n_d = 1, 1,2</math> y <math>1,4</math>.</i>	24
<i>Figura 7 – Distribución espacial transversal de campo magnético de un SPP en una interfase agua/oro (<math>n_d = 1.3323</math> RIU / <math>\epsilon_m = -11,8+1,246\cdot i</math>) y agua/plata (<math>n_d = 1.3323</math> RIU/ <math>\epsilon_m = -18,4+2,3\cdot i</math>), para una <math>\lambda = 633</math> nm.</i>	25
<i>Figura 8 – Distancia de penetración de un SPP en el metal (<math>L_m</math>) y en el dieléctrico (<math>L_d</math>) como función de la longitud de onda de excitación. En el cálculo, se supuso agua como medio dieléctrico (<math>n_d = 1.3323</math>) y como metal oro (izquierda) o plata (derecha).</i>	26
<i>Figura 9 – Distancia de propagación de un SPP en función de la longitud de onda de excitación. En el cálculo, se supuso agua como medio dieléctrico (<math>n_d = 1.3323</math>) y como metal oro (línea roja) o plata (línea azul).</i>	27
<i>Figura 10 – Modos plasmónicos de una capa metálica de espesor finito.</i>	28
<i>Figura 11 – Componentes real (izquierda) e imaginaria (derecha) del <math>k_{spp}</math> generado en una capa metálica de oro de espesor finito <math>h</math> y estructura simétrica. La línea discontinua representa el valor del <math>k_{spp}</math> de una única interfase formada por los mismos medios.</i>	29
<i>Figura 12 – Componentes real (izquierda) e imaginaria (derecha) del <math>k_{spp}</math> generado en una capa metálica de oro de espesor finito <math>h</math> y estructura asimétrica. Las líneas discontinuas representan los valores de <math>k_{spp}</math> asociados a una única interfase formada por oro y el medio dieléctrico de menor índice de refracción (<math>d1</math>) y por oro y el medio dieléctrico de mayor índice de refracción (<math>d2</math>).</i>	30

<i>Figura 13 – Situación de no-excitación del SPP.</i>	31
<i>Figura 14 – (a) Relación de dispersión <math>\omega(k)</math> del SPP en una interfase metal/dieléctrico. En (b) se muestra, suponiendo que el metal está formado por un gas de electrones libres sin absorción, la <math>\omega(k)</math> para dos constantes dieléctricas distintas <math>\epsilon_1</math> y <math>\epsilon_2</math>. En este último caso, estas relaciones se comparan con las relaciones de dispersión de una onda plana propagándose en los mismos dieléctricos (líneas rectas).</i>	31
<i>Figura 15 – Excitación del SPP mediante acoplamiento por prisma. Esquemas de las configuraciones de acoplamiento: configuración de Otto (izquierda) y Kretschmann (derecha).</i>	33
<i>Figura 16 – Esquema de excitación del SPP mediante una red de difracción.</i>	34
<i>Figura 17 – Esquema de excitación del SPP mediante luz guiada.</i>	35
<i>Figura 18 – Esquema de un biosensor SPR basado en acoplamiento por prisma mediante configuración de Kretschmann.</i>	39
<i>Figura 19 – Curvas representativas de: (a) la resonancia angular y (b) espectral producida en configuración de Kretschmann.</i>	40
<i>Figura 20 – Relación entre la longitud de onda y el ángulo de excitación del SPP de la geometría indicada en la Figura 32 para dos espesores distintos de la capa de Au.</i>	41
<i>Figura 21 – (a) Cambio de índice de refracción volumétrico y (b) superficial del medio externo. (c) Esquema general del Principio de funcionamiento de un sensor SPR basado en la configuración de Kretschmann (geometría y notación empleada).</i>	41
<i>Figura 22 – Variación del vector de ondas del SPP ante un cambio de índice de refracción volumétrico del medio dieléctrico de un MII excitado en configuración de Kretschmann (líneas continuas) y del SPP de una única interfase metal/dieléctrico (líneas discontinuas).</i>	42
<i>Figura 23 – Variación del vector de ondas del SPP de una única interfase metal/dieléctrico ante un cambio de índice de refracción volumétrico del medio dieléctrico de <math>10^{-2}</math> RIU para tres valores diferentes de <math>n_d</math> (1, 1.2 y 1.4 RIU).</i>	44
<i>Figura 24 – Esquema de: (a) la variación del ángulo de excitación del SPP de la curva angular de resonancia y (b) la variación de la longitud de onda de excitación del SPP de la curva espectral de resonancia debida a un pequeño cambio <math>\delta\epsilon</math>.</i>	45
<i>Figura 25 – Esquema de una SAM</i>	48
<i>Figura 26 – Clasificación de los biosensores SPR basados en acoplamiento mediante prisma.</i>	48
<i>Figura 27 – Biosensor SPR-angular.</i>	50
<i>Figura 28 – Biosensor SPR-espectral.</i>	50
<i>Figura 29 – Biosensor SPR de intensidad.</i>	51

<i>Figura 30 – (a) Reflectancia angular experimentada por una lámina de oro con distintos espesores cuando la longitud incidente es de 633 nm y (b) vista detalle en torno al ángulo de excitación del SPP.</i>	52
<i>Figura 31 – Espesores óptimos de la capa de oro (a) y (c), y curvas angulares (b) y espectros (d) de reflectancia para algunos de los espesores óptimos calculados.</i>	53
<i>Figura 32 – Geometría y notación empleada en el análisis teórico de sensibilidad del biosensor SPR.</i>	55
<i>Figura 33 – Sensibilidad en función de la longitud de onda incidente para el biosensor SPR de intensidad: (a) en porcentaje de reflectancia/RIU y (b) normalizado entre [0,1].</i>	55
<i>Figura 34 – (a) Anchura angular y (b) espectral de la curva de resonancia en función de la longitud de onda y del ángulo incidente evaluada en <math>R_{pp} = 5\%</math>. Sensibilidad normalizada para el (c) sensor SPR-angular y (d) sensor SPR-espectral en función de la longitud de onda incidente.</i>	56
<i>Figura 35 – Esquema y notación empleada para referirse a la variación del vector de ondas del SPP <math>\delta k_{spp}</math> como consecuencia de: (a) la variación del índice de refracción del medio externo <math>\delta n</math> y (b) como consecuencia de la alteración del vector de ondas del SPP <math>\Delta k_{spp}</math> debida a la alteración <math>\Delta n</math> de la constante dieléctrica del metal.</i>	64
<i>Figura 36 – Modulación plasmónica: (b) variación angular producida en la curva angular de resonancia como consecuencia de la alteración de la constante dieléctrica del metal <math>\Delta \epsilon</math> y (c) curvas angulares de variación y de variación relativa de reflectancia.</i>	65
<i>Figura 37 – Esquema comparativo de la respuesta sensora de (a) un biosensor SPR convencional y (b) un biosensor SPR-modulado ante un mismo cambio de índice de refracción del medio externo <math>\delta n</math>.</i>	66
<i>Figura 38– Configuración (a) polar, (b) longitudinal y (c) transversal del efecto Faraday [en transmisión] y Kerr [en reflexión].</i>	70
<i>Figura 39 – Efecto TMOKE en (a) medios paramagnéticos y (b) en medios ferromagnéticos.</i>	74
<i>Figura 40 – Modulación magneto-óptica del SPP en configuración de Kretschmann y a longitud de onda constante. Curvas angulares de (a) reflectancia, (b) detalle del mínimo de reflectancia, (c) reflectancia y variación de reflectancia MO y (d) reflectancia y variación relativa de reflectancia MO.</i>	75
<i>Figura 41 – Curva de resonancia angular generada en una capa de 50 nm de Au y en una de 20 nm de Co cuando se emplea agua (<math>n_d=1.3323</math> RIU) como medio dieléctrico y <math>\lambda=633</math> nm.</i>	77
<i>Figura 42 – Esquema del Sistema transductor empleado en esta tesis.</i>	77
<i>Figura 43 – Esquema de (a) el electroimán empleado en configuración TMOKE y (b) de la señal temporal de excitación del electroimán y de imanación de una estructura MP.</i>	79

<i>Figura 44 – Esquema del Sistema óptico de detección empleado en el sistema experimental inicial del biosensor MOSPR: (a) Fuentes de luz y (b) sistema de excitación y detección del SPP.</i>	79
<i>Figura 45 – Elementos principales del Sistema de flujo empleado.</i>	81
<i>Figura 46 – Esquema de los tipos de procesamiento de señal: (a) hardware y (b) software.</i>	83
<i>Figura 47 – Capturas de pantalla de los programas de control y visualización de datos empleados durante esta tesis. En la parte superior, en función del ángulo y en la parte inferior, en función del tiempo.</i>	84
<i>Figura 48 – Capturas de pantalla de los programas de control y visualización de datos empleados durante esta tesis. En la parte superior, en función del ángulo y en la parte inferior, en función del tiempo.</i>	85
<i>Figura 49 – Sistema experimental MOSPR empleado en el apartado 5.2.7 de esta memoria de tesis doctoral. (a) Vista lateral en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos. Vistas (b) general, (c) cenital y (d) frontal del sistema experimental.</i>	87
<i>Figura 50 – Vista esquemática de las condiciones y el transductor magneto-plasmónico empleado en este apartado.</i>	89
<i>Figura 51 – (Arriba) Comparativa experimental, para 3 muestras representativas de cada set, entre <math>\Delta R_{pp}</math> y la derivada angular de <math>R_{pp}</math> multiplicada por su correspondiente factor <math>\Delta\theta_{MO}</math>. (Abajo) El <math>\Delta\theta_{MO}</math> experimentalmente obtenido para cada una de las tricapas Au/Fe/Au fabricadas.</i>	90
<i>Figura 52 – Curvas <math>\Delta R_{pp}/R_{pp}</math> experimentales para (izquierda) el set de 3 nm de Fe y (derecha) el set de 5 nm Fe.</i>	90
<i>Figura 53 – Valores experimentales de: (a) incremento de TMOKE <math>(\Delta R/R)_{max}</math>, (b) pendiente de medida de <math>\Delta R_{pp}/R_{pp}</math> (su derivada en <math>\theta_{spp}</math>), (c) mínimo valor de reflectancia (<math>R_{pp}</math> (<math>\theta=\theta_{spp}</math>)) para todas las estructuras fabricadas y como función del espesor de la capa superior de oro <math>d_{Autop}</math>. (d) curvas angulares de reflectancia para dos espesores de Fe situados a la misma distancia de la interfase metal/dieléctrico.</i>	91
<i>Figura 54 – (Izquierda) Curva angular de <math>\Delta R_{pp}</math> experimental y teórica, de una estructura Au/Fe/Au con (<math>d_{Autop} = 30</math> nm, <math>d_{Fe} = 5</math> nm y <math>d_{Aubottom} = 5</math> nm). (Derecha) Ejemplo esquemático de la situación ideal supuesta en los cálculos teóricos (interfases planas) y de la verdadera situación (interfases rugosas) causante de la gran disminución experimental observada en las tricapas Au/Fe/Au.</i>	92
<i>Figura 55 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR (30nm Au<sub>top</sub>/5nm Fe/5nm Au<sub>bottom</sub>) y del SPR (48 nm Au) ante los mismos cambios de índice de refracción. (Izquierda) Variación temporal de la señal MOSPR para diferentes <math>\delta n</math> y (derecha) gráfica comparativa de la respuesta sensora de ambos biosensores. En la figura recuadrada se muestra la respuesta temporal (SNR) de ambos sensores ante un mismo cambio de índice de refracción (<math>\delta n = 2 \cdot 10^{-4}</math> RIU).</i>	93



Figura 56 – (a) Curvas angulares de  $\Delta R_{pp}$  y (b) respuesta sensora ante un cambio de índice de refracción volumétrico  $\delta n = 8 \cdot 10^{-4}$  RIU para dos tricapas MP Au/Fe/Au y Au/Co/Au con idénticos espesores. \_\_\_\_\_ 94

Figura 57 – Vista esquemática de las condiciones y el transductor magneto-plasmónico empleado en este apartado. \_\_\_\_\_ 94

Figura 58 – Análisis teórico de la sensibilidad de un transductor MP Au/Co/Au. (a) Espesores óptimos teóricos de  $d_{\text{Aubottom}}$  para cada combinación de espesores  $[d_{\text{Autop}} - d_{\text{Co}}]$ . Para cada combinación de espesores optimizada, se podrá determinar: (b) los valores mínimos de reflectancia alcanzados en el ángulo de excitación ( $R_{pp}(\theta_{\text{spr}})$ ), (c) el máximo valor de  $\Delta R_{pp}$  y (d) la sensibilidad del MOSPR de un transductor MP en función de  $d_{\text{Autop}}$  y  $d_{\text{Co}}$ . En todos los mapas de contorno, la línea azul divide la región de bicapas (aquella en la que la estructura optimizada tiene un  $d_{\text{Aubottom}}=0$ ) de la región de tricapas (aquella en la que la estructura optimizada tiene un  $d_{\text{Aubottom}} \neq 0$ ). Finalmente, en la figura (d) las posiciones de los números rojos indican las combinaciones de espesores  $[d_{\text{Autop}} - d_{\text{Co}}]$  experimentalmente evaluadas, mientras que el valor numérico se refiere a la combinación de espesores. \_\_\_\_\_ 97

Figura 59 – Análisis experimental de la sensibilidad de un transductor MP Au/Co/Au. (a) Variación de  $\Delta R_{pp}(\theta = \theta_{\text{spr}})$  producida por un cambio de índice de refracción del medio externo  $\delta n_d = 6 \cdot 10^{-4}$  RIU para los transductores N° 3 y 6. (b) Valores teóricos y experimentales de la sensibilidad del MOSPR para las combinaciones de espesores indicadas en la Tabla 5. Finalmente, valores teóricos y experimentales de  $\eta_{\text{MOSPR}}$  para: (c) valores constantes de  $d_{\text{Autop}}$  y como función de  $d_{\text{Co}}$  y (d) viceversa. \_\_\_\_\_ 99

Figura 60 – Curvas experimentales de  $R_{pp}$ ,  $\Delta R_{pp}$  y de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  para los transductores N° 5 y 9. \_\_\_\_\_ 100

Figura 61 – Espesores óptimos teóricos de  $d_{\text{Aubottom}}$  para cada combinación de espesores  $[d_{\text{Autop}} - d_{\text{Co}}]$  y para diferentes longitudes de onda. \_\_\_\_\_ 102

Figura 62 – Valor de  $\Delta R_{pp}$  de un transductor MP en función de la combinación  $d_{\text{Autop}} - d_{\text{Co}}$  y de la longitud de onda incidente para cada combinación de espesores optimizada. \_\_\_\_\_ 103

Figura 63 – Valor de la sensibilidad relativa del MOSPR de un transductor MP en función de la combinación  $d_{\text{Autop}} - d_{\text{Co}}$  y de la longitud de onda incidente para cada combinación de espesores optimizada \_\_\_\_\_ 104

Figura 64 – (a) Sensibilidad en función de la longitud de onda para la estructura que posea el máximo  $\eta_{\text{MOSPR}}$  a cada  $\lambda$  [cuadrados] o para una estructura formada por 20nm Au/3 nm Co/ $d_{\text{Aubottom}}$  [círculos], siendo este último espesor el que optimiza la resonancia. (b) Respuesta espectral teórica de la sensibilidad del biosensor SPR y del MOSPR. (c) Variación de  $R_{pp}$  y de  $\Delta R_{pp}$  ante un cambio de índice de refracción del medio externo. (d) Sensibilidad normalizada en función de la longitud de onda incidente para el sensor SPR [línea roja] y para el sensor MOSPR [círculos azules]. \_\_\_\_ 106

Figura 65 – Prueba de resistencia del transductor MP a disoluciones ácidas. Evolución de: (a) la curva angular de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , (b) de la reflectancia en el ángulo de

excitación, (c) el valor de  $R_{pp}(\theta_{spp})$  y  $(\Delta R/R)_{max}$  de una estructura formada por 12nm  $Au_{top}/7nm\ Co/12nm\ Au_{bottom}$ . Finalmente, (d) muestra una imagen de microscopio del deterioro experimentado por la superficie del transductor tras ser atacada por las disoluciones de HCl. \_\_\_\_\_ 107

Figura 66 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR y del SPR ante un mismo cambio de índice de refracción volumétrico  $\delta n = 5,6 \cdot 10^{-5}$  RIU. \_\_\_\_\_ 108

Figura 67 – Sistema experimental MOSPR empleado en los apartados 5.4 y 5.5 de esta memoria de tesis doctoral. (a) Vista general del sistema y (b) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 7 \_ 109

Figura 68 – Curvas angulares de detección para el transductor plasmónico y el transductor MP. \_\_\_\_\_ 110

Figura 69 – Vista esquemática del protocolo de inmovilización de ADN empleado en este apartado. \_\_\_\_\_ 111

Figura 70 – Respuesta sensora del biosensor MOSPR y el SPR al protocolo indicado en la Tabla 8. \_\_\_\_\_ 112

Figura 71 – Desplazamiento angular experimentado por el biosensor MOSPR y el SPR durante el proceso de inmovilización llevado a cabo. (a) Desplazamiento acumulado desde la curva inicial, (b) Curvas angulares de  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$ , (c) curvas angulares de  $R_{pp}$  del biosensor SPR y (d) del biosensor MOSPR. \_\_\_\_\_ 113

Figura 72 – Modulación en longitud de onda del SPP en configuración de Kretschmann. (a) Curva angular de reflectancia, (b) dependencia en  $\lambda$  de la constante dieléctrica del metal y del vector de ondas del SPP. En (c) curvas angulares de reflectancia y variación en  $\lambda$  de reflectancia, y (d) reflectancia y variación relativa de reflectancia. \_\_\_\_\_ 119

Figura 73 – Esquema básico del sistema inicial del sensor  $\lambda$ MSPR. \_\_\_\_\_ 121

Figura 74 – Captura de pantalla del sistema de visualización de datos. \_\_\_\_\_ 123

Figura 75 – Vista esquemática del transductor y de las condiciones de medida empleadas en el biosensor  $\lambda$ MSPR. \_\_\_\_\_ 123

Figura 76 – (a) y (b) muestra las curvas angulares de  $R_{pp}$  y  $\Delta R_{pp}/R_{pp}$  en función de  $d_{Au}$  para estructuras  $n_d=1.3323$  RIU/ $Au/2nm\ Ti/BK7$  en las que  $\lambda_0 = 660\ nm$ ,  $\Delta\lambda = 1\ nm$ , mientras que en (c) y (d)  $\lambda_0 = 780\ nm$ ,  $\Delta\lambda = 1\ nm$ . \_\_\_\_\_ 125

Figura 77 – Curvas angulares de  $R_{pp}$  (izquierda) y  $\Delta R_{pp}$  (derecha) en estructuras  $n_d=1.3323$  RIU/ $Au/2nm\ Ti/BK7$  cuando  $\lambda_0 = 633, 660, 720$  y  $780\ nm$  y  $\Delta\lambda = 1\ nm$ . \_\_\_\_ 125

Figura 78 – Definición gráfica de los parámetros representativos. \_\_\_\_\_ 126

Figura 79 – Parámetros representativos del biosensor  $\lambda$ MSPR en función de  $\lambda_0$  para una estructura  $n_d=1.3323$  RIU/ $Au/2nm\ Ti/BK7$  con el espesor  $d_{Au}$  óptimo para cada  $\lambda_0$  y cuando  $\Delta\lambda = 1\ nm$ . \_\_\_\_\_ 127

<i>Figura 80 – Parámetros representativos del biosensor <math>\lambda</math>MSPR en función de <math>\Delta\lambda</math> para una estructura <math>n_d=1.3323</math> RIU/Au/2nm Ti/BK7 con el espesor <math>d_{Au}</math> óptimo para cada <math>\lambda_0 = 660</math> nm.</i>	128
<i>Figura 81 – (a) Dependencia espectral de <math>\eta_{\lambda\text{MSPR}}</math> de un transductor Au/2nm Ti y del cociente entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica del Au. (b) Sensibilidad normalizada del sensor SPR, MOSPR y <math>\lambda</math>MSPR. Respuesta espectral (teórica) de la sensibilidad de los sensores MOSPR y <math>\lambda</math>MSPR para (c) <math>\Delta\lambda = 1</math> nm y (d) <math>\Delta\lambda = 0,25</math> nm.</i>	129
<i>Figura 82 – Sistema experimental inicial del sensor <math>\lambda</math>MSPR inicialmente desarrollado. (a) Vista general y (b) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 9.</i>	131
<i>Figura 83 – Caracterización experimental del diodo láser de estructura heterogénea (modelo DL7140-201S de la marca Sanyo).</i>	134
<i>Figura 84 – Caracterización experimental del diodo DFB (modelo EYP-DFB-780 de la marca EagleYard).</i>	136
<i>Figura 85 – Incremento experimentado por los valores de reflectancia alcanzados en el ángulo de excitación del SPP de una estructura Au/2 nm Ti como consecuencia de la focalización que produce un prisma semicircular en un haz incidente no-puntual, cuyo diámetro no puede ser despreciado.</i>	137
<i>Figura 86 – Sistema óptico de excitación y detección del SPP en configuración de Kretschmann con un prisma trapezoidal.</i>	138
<i>Figura 87 – Sistema experimental <math>\lambda</math>MSPR empleado en la caracterización y comparación realizada en esta tesis doctoral. (a) vista cenital en la que, mediante números, se indican los diferentes elementos descritos en la Tabla 10. (b-c) Vista detalle del sistema experimental y (d-f)) vista general del sistema experimental empleado en el biosensor <math>\lambda</math>MSPR.</i>	140
<i>Figura 88 – Optimización experimental de la resonancia de plasmón. Influencia de: (a) material empleado en el prisma, (b) índice de refracción del aceite de acoplamiento, (c) calidad del pulido del sustrato empleado y (d) tamaño de la celda.</i>	142
<i>Figura 89 – Optimización experimental de la resonancia de plasmón. Influencia de la velocidad de deposición y (b) horneado de la estructura plasmónica.</i>	142
<i>Figura 90 – Influencia del espesor de la capa de adhesión en la curva angular <math>R_{pp}</math>.</i>	143
<i>Figura 91 – Curvas angulares de (a) reflectancia y (b) variación relativa de reflectancia del transductor plasmónico empleado en la caracterización experimental del sensor <math>\lambda</math>MSPR. Para cada curva angular se muestra [líneas azules] su respectiva derivada angular.</i>	144
<i>Figura 92 – Variación de señal experimentada por (a) el sensor SPR y (b) el sensor <math>\lambda</math>MSPR ante tres cambios de índice de refracción de <math>\Delta n=1.6 \times 10^{-4}</math> RIU.</i>	144
<i>Figura 93 – (a) Señales base con las que determinar el ruido experimental del sistema. (b) Respuesta sensora del sensor SPR y del <math>\lambda</math>MSPR.</i>	145

**Figuras incluidas en los Apéndices**

<i>Figura A. 1– Constante dieléctrica de: (a) oro (Fuente: Jonhson [172]) y (b) plata (Fuente: Palik [173]).</i>	153
<i>Figura A. 2– Constante dieléctrica de: (a) titanio y (b) cromo (Fuente: Johnson [172]).</i>	153
<i>Figura A.3 – Constante dieléctrica del hierro y del cobalto: (a y b) ópticas y (c y d) magneto-ópticas (Fuente: Lee [174]).</i>	154
<i>Figura A.4 – Constante dieléctrica experimental del oro determinada por elipsometría en el IMM-CNM (CSIC).</i>	155
<i>Figura A.5 – Constantes dieléctricas experimentales del cobalto determinadas por elipsometría en el IMM-CNM (CSIC): (a) ópticas y (b) magneto-ópticas.</i>	155
 <i>Figura B. 1 – Representación esquemática de (a) una monocapa de espesor <math>d</math> y tensor dieléctrico <math>\varepsilon</math> y (b) de un sistema de multicapas formada por un número arbitrario <math>n</math> de capas de espesor <math>d_n</math> y tensor dieléctrico <math>\varepsilon_n</math>. Las ondas incidente, reflejada y transmitida están caracterizadas por su vector de ondas, su ángulo y por las componentes de polarización <math>p</math> y <math>s</math>.</i>	157
 <i>Figura C. 1 – Ejemplo de aplicación biosensora: (a) sensograma de la inmovilización de BSA mediante enlace covalente (procesos [1] a [3]) y (b) sensograma de la detección de la unión BSA-antiBSA (procesos [4] y [6]) y su posterior desunión o regeneración (procesos [5] y [7]).</i>	161
<i>Figura C. 2 – Detalle de los procesos [1] y [2]. (a) y (b) curvas angulares del desplazamiento generado durante la creación de la SAM y la inmovilización del receptor, respectivamente. (c) y (d) Comparativa entre la derivada de <math>R_{pp}</math> y la curva angular de desplazamiento producida tras la creación de la SAM y la inmovilización del receptor, respectivamente.</i>	163

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1 – Comparativa general entre biosensores y técnicas analíticas.</i>	7
<i>Tabla 2 – Tipos de biosensores según el tipo de receptor o transductor empleado.</i>	11
<i>Tabla 3 – Comparativa sensora entre los diferentes tipos de biosensores ópticos basados en campo evanescente.</i>	14
<i>Tabla 4– Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 49.</i>	85
<i>Tabla 5 – Parámetros experimentales (espesores nominales y valor de reflectancia alcanzado en la condición de resonancia) de los transductores MP fabricados.</i>	98
<i>Tabla 6 – Constantes ópticas y MO empleadas en la determinación de la sensibilidad del biosensor MOSPR en función de la longitud de onda.</i>	101
<i>Tabla 7 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 67.</i>	108
<i>Tabla 8 – Protocolo de inmovilización e hibridación empleado.</i>	111
<i>Tabla 9 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 82.</i>	131
<i>Tabla 10 – Tabla de los elementos constituyentes del sistema experimental indicado en la Figura 87.</i>	138
<i>Tabla 11 – Protocolo empleado en el ejemplo de aplicación biosensora del SPR.</i>	162



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Sepúlveda, D. Regatos, G. Armelles, D. Fariña, and L. M. Lechuga, “Método para el análisis del índice de refracción de un medio dieléctrico adyacente a un medio plasmónico y dispositivo correspondiente” Número de solicitud: P201030166 País de prioridad: España (Feb. 2010).
- [2] A. Rasooly and K. E. Herold, *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols Volume 1: Optical-Based Detectors*, 1st ed., Humana Press (2008).
- [3] A. Rasooly and K. E. Herold, *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols Volume 2: Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors*, 1st ed., Humana Press (2008).
- [4] J. Wang, “Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges,” *Electroanalysis* **13**, 983–988 (2001) [doi:10.1002/1521-4109].
- [5] L. Gorton, *Biosensors and modern biospecific analytical techniques*, Elsevier (2005).
- [6] M. A. Cooper, *Label-Free Biosensors: Techniques and Applications*, 1st ed., Cambridge University Press (2009).
- [7] Rajender Thusu, “Strong Growth Predicted for Biosensors Market,” in *Sensors* (2010).
- [8] W. K. Kwong, “Catalytic biosensors : novel analytical tools and their applications in sports, food and environmental monitoring” (2000).
- [9] K. Rogers and A. Mulchandani, *Affinity Biosensors: Techniques and Protocols*, Softcover reprint of hardcover 1st ed. 1998, Humana Press (2011).
- [10] S. K. Hartwell and K. Grudpan, “Flow based immuno/bioassay and trends in micro-immuno/biosensors,” *Microchim Acta* **169**, 201–220 (2010) [doi:10.1007/s00604-010-0333-1].
- [11] W. Vercoutere and M. Akeson, “Biosensors for DNA sequence detection,” *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 816–822 (2002) [doi:10.1016/S1367-5931(02)00395-2].
- [12] F. R. R. Teles and L. P. Fonseca, “Trends in DNA biosensors,” *Talanta* **77**, 606–623 (2008) [doi:16/j.talanta.2008.07.024].
- [13] Dorothee Grieshaber, Robert MacKenzie, Janos Vörös, and Erik Reimhult, “Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures” (2008) [doi:10.3390/s8031400].
- [14] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, “Electrochemical biosensors,” *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747 (2010) [doi:10.1039/b714449k].
- [15] A. B. González-Guerrero, E. Mendoza, E. Pellicer, F. Alsina, C. Fernández-

- Sánchez, and L. M. Lechuga, "Discriminating the carboxylic groups from the total acidic sites in oxidized multi-wall carbon nanotubes by means of acid-base titration," *Chemical Physics Letters* **462**, 256–259 (2008) [doi:16/j.cplett.2008.07.071].
- [16] C. B. Jacobs, M. J. Peairs, and B. J. Venton, "Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules," *Analytica Chimica Acta* **662**, 105–127 (2010) [doi:16/j.aca.2010.01.009].
- [17] G. N. M. Ferreira, A.-C. da-Silva, and B. Tomé, "Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance," *Trends in Biotechnology* **27**, 689–697 (2009) [doi:10.1016/j.tibtech.2009.09.003].
- [18] J. L. Arlett, E. B. Myers, and M. L. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors," *Nat Nano* **6**, 203–215 (2011) [doi:10.1038/nnano.2011.44].
- [19] J. Llandro, J. J. Palfreyman, A. Ionescu, and C. H. W. Barnes, "Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review," *Med Biol Eng Comput* **48**, 977–998 (2010) [doi:10.1007/s11517-010-0649-3].
- [20] C. H. Marrows, "Magnetic Biosensor Techniques" (2008) [doi:10.1002/9780470061565.hbb068].
- [21] F. S. Ligler, *Optical biosensors: today and tomorrow*, Elsevier (2008).
- [22] L. C. Clark Jr. and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.," *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29–45 (1962) [doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x].
- [23] L. M. Lechuga, "Micro- and nanoimmunosenors: technology and applications," *Anal Bioanal Chem* **384**, 44–46 (2006) [doi:10.1007/s00216-005-0180-9].
- [24] J. Fritz, "Cantilever biosensors," *Analyst* **133**, 855 (2008) [doi:10.1039/b718174d].
- [25] R. S. Gaster, D. A. Hall, C. H. Nielsen, S. J. Osterfeld, H. Yu, K. E. Mach, R. J. Wilson, B. Murmann, J. C. Liao, et al., "Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine," *Nat Med* **15**, 1327–1332 (2009) [doi:10.1038/nm.2032].
- [26] A. Baba, W. Knoll, and R. Advincula, "Simultaneous in situ electrochemical, surface plasmon optical, and atomic force microscopy measurements: Investigation of conjugated polymer electropolymerization," *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 064101 (2006) [doi:10.1063/1.2204587].
- [27] S. Wang, X. Huang, X. Shan, K. J. Foley, and N. Tao, "Electrochemical Surface Plasmon Resonance: Basic Formalism and Experimental Validation," *Analytical Chemistry* **82**, 935–941 (2010) [doi:10.1021/ac902178f].
- [28] J. Davies, A. C. Dawkes, A. G. Haymes, R. F. Sunderland, and J. C. Edwards, "Scanning tunnelling microscopy and dynamic contact angle studies of the effects of partial denaturation on immunoassay solid phase antibody," *Journal of Immunological Methods* **186**, 111–123 (1995) [doi:16/0022-1759(95)00141-V].
- [29] R. W. Nelson, J. R. Krone, and O. Jansson, "Surface Plasmon Resonance Biomolecular Interaction Analysis Mass Spectrometry. 1. Chip-Based Analysis," *Analytical Chemistry* **69**, 4363–4368 (1997) [doi:10.1021/ac970538w].



- [30] F. Bender, P. Roach, A. Tsortos, G. Papadakis, M. I. Newton, G. McHale, and E. Gizeli, "Development of a combined surface plasmon resonance/surface acoustic wave device for the characterization of biomolecules," *Meas. Sci. Technol.* **20**, 124011 (2009) [doi:10.1088/0957-0233/20/12/124011].
- [31] J. Kim, S. Kim, T. Ohashi, H. Muramatsu, S.-M. Chang, and W.-S. Kim, "Construction of simultaneous SPR and QCM sensing platform," *Bioprocess Biosyst Eng* **33**, 39–45 (2009) [doi:10.1007/s00449-009-0370-5].
- [32] L. J. Blum, S. M. Gautier, and P. R. Coulet, "Fibre optic biosensors with immobilized bioluminescence enzymes," *J Mater Sci: Mater Med* **2**, 202–204 (1991) [doi:10.1007/BF00703370].
- [33] J. R. Astles, W. G. Miller, C. M. Hanbury, and F. P. Anderson, "Fiberoptic Immunosensors with Continuous Analyte Response," in *Affinity Biosensors* **7**, pp. 99–120, Humana Press, New Jersey (1998).
- [34] D. Marcuse and A. T. and T. Company, *Theory of dielectric optical waveguides*, Academic Press (1991).
- [35] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," *Analytica Chimica Acta* **620**, 8–26 (2008) [doi:10.1016/j.aca.2008.05.022].
- [36] A. Leung, P. M. Shankar, and R. Mutharasan, "A review of fiber-optic biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical* **125**, 688–703 (2007) [doi:10.1016/j.snb.2007.03.010].
- [37] N. J. Goddard, D. Pollard-Knight, and C. H. Maule, "Real-time biomolecular interaction analysis using the resonant mirror sensor," *Analyst* **119**, 583 (1994) [doi:10.1039/an9941900583].
- [38] M. Zourob, S. Elwary, X. Fan, S. Mohr, and N. J. Goddard, "Label-Free Detection with the Resonant Mirror Biosensor," in *Biosensors and Biodetection* **503**, A. Rasooly and K. E. Herold, Eds., pp. 89–138, Humana Press, Totowa, NJ (2009).
- [39] K. E. Zinoviev, A. B. Gonzalez-Guerrero, C. Dominguez, and L. M. Lechuga, "Integrated Bimodal Waveguide Interferometric Biosensor for Label-Free Analysis," *Journal of Lightwave Technology* **29**, 1926–1930 (2011) [doi:10.1109/JLT.2011.2150734].
- [40] A. Brandenburg, "Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer," *Sensors and Actuators B: Chemical* **39**, 266–271 (1997) [doi:10.1016/S0925-4005(97)80216-X].
- [41] W. B. J. Spillman, *Fiber Optic Sensors: An Introduction for Engineers and Scientists*, John Wiley and Sons (2011).
- [42] R. G. Heideman, R. P. H. Kooyman, and J. Greve, "Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical* **10**, 209–217 (1993) [doi:10.1016/0925-4005(93)87008-D].
- [43] F. Prieto, B. Sepúlveda, A. Calle, A. Llobera, C. Domínguez, and L. M. Lechuga, "Integrated Mach-Zehnder interferometer based on ARROW structures for biosensor applications," *Sensors and Actuators B: Chemical* **92**, 151–158 (2003) [doi:10.1016/S0925-4005(03)00257-0].

- [44] B. H. Schneider, J. G. Edwards, and N. F. Hartman, "Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens," *Clin Chem* **43**, 1757–1763 (1997).
- [45] M. R. Lee and P. M. Fauchet, "Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection," *Opt. Express* **15**, 4530–4535 (2007) [doi:10.1364/OE.15.004530].
- [46] C. J. Choi, I. D. Block, B. Bole, D. Dralle, and B. T. Cunningham, "Label-Free Photonic Crystal Biosensor Integrated Microfluidic Chip for Determination of Kinetic Reaction Rate Constants," *IEEE Sensors Journal* **9**, 1697–1704 (2009) [doi:10.1109/JSEN.2009.2030666].
- [47] A. Ramachandran, S. Wang, J. Clarke, S. J. Ja, D. Goad, L. Wald, E. M. Flood, E. Knobbe, J. V. Hryniewicz, et al., "A universal biosensing platform based on optical micro-ring resonators," *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 939–944 (2008) [doi:10.1016/j.bios.2007.09.007].
- [48] I. M. White and X. Fan, "On the performance quantification of resonant refractive index sensors," *Opt. Express* **16**, 1020–1028 (2008) [doi:10.1364/OE.16.001020].
- [49] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström, "Biosensing with surface plasmon resonance -- how it all started," *Biosensors and Bioelectronics* **10**, i-ix (1995) [doi:10.1016/0956-5663(95)96965-2].
- [50] J. Homola, "Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species," *Chemical Reviews* **108**, 462–493 (2008) [doi:10.1021/cr068107d].
- [51] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, and R. P. Van Duyne, "Biosensing with plasmonic nanosensors," *Nat Mater* **7**, 442–453 (2008) [doi:10.1038/nmat2162].
- [52] K. M. Mayer and J. H. Hafner, "Localized Surface Plasmon Resonance Sensors," *Chemical Reviews* **111**, 3828–3857 (2011) [doi:10.1021/cr100313v].
- [53] F. Xu, P. Horak, and G. Brambilla, "Optical microfiber coil resonator refractometric sensor: erratum," *Opt. Express* **15**, 9385 (2007) [doi:10.1364/OE.15.009385].
- [54] P. V. Lambeck, "Integrated optical sensors for the chemical domain," *Meas. Sci. Technol.* **17**, R93–R116 (2006) [doi:10.1088/0957-0233/17/8/R01].
- [55] K. Zinoviev, L. G. Carrascosa, J. Sanchez del Rio, B. Sepulveda, C. Dominguez, and L. M. Lechuga, "Silicon photonic biosensors for lab-on-a-chip applications," *Adv. Opt. Technol.* **2008**, 383927 (2008) [doi:10.1155/2008/383927].
- [58] A. Brandenburg, R. Krauter, C. Künzel, M. Stefan, and H. Schulte, "Interferometric Sensor for Detection of Surface-Bound Bioreactions," *Appl. Opt.* **39**, 6396–6405 (2000) [doi:10.1364/AO.39.006396].
- [57] K. Schmitt, B. Schirmer, C. Hoffmann, A. Brandenburg, and P. Meyrueis, "Interferometric biosensor based on planar optical waveguide sensor chips for label-free detection of surface bound bioreactions," *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 2591–2597 (2007) [doi:10.1016/j.bios.2006.10.016].
- [58] J. Xu, D. Suarez, and D. S. Gottfried, "Detection of avian influenza virus using an interferometric biosensor," *Anal Bioanal Chem* **389**, 1193–1199 (2007)

- [doi:10.1007/s00216-007-1525-3].
- [59] B. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, "Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique," *Sensors and Actuators B: Chemical* **81**, 316–328 (2002) [doi:16/S0925-4005(01)00976-5].
  - [60] M. S. Luchansky, A. L. Washburn, T. A. Martin, M. Iqbal, L. C. Gunn, and R. C. Bailey, "Characterization of the evanescent field profile and bound mass sensitivity of a label-free silicon photonic microring resonator biosensing platform," *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 1283–1291 (2010) [doi:16/j.bios.2010.07.010].
  - [61] M. Iqbal, M. A. Gleeson, B. Spaugh, F. Tybor, W. G. Gunn, M. Hochberg, T. Baehr-Jones, R. C. Bailey, and L. C. Gunn, "Label-Free Biosensor Arrays Based on Silicon Ring Resonators and High-Speed Optical Scanning Instrumentation," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **16**, 654–661 (2010) [doi:10.1109/JSTQE.2009.2032510].
  - [62] M. A. Otte, M.-C. Estévez, L. G. Carrascosa, A. B. González-Guerrero, L. M. Lechuga, and B. Sepúlveda, "Improved Biosensing Capability with Novel Suspended Nanodisks," *J. Phys. Chem. C* **115**, 5344–5351 (2011) [doi:10.1021/jp110363a].
  - [63] R. W. Wood, "On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum," *Proc. Phys. Soc. London* **18**, 269–275 (1902) [doi:10.1088/1478-7814/18/1/325].
  - [64] L. Rayleigh, "On the Dynamical Theory of Gratings," *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **79**, 399–416 (1907) [doi:10.1098/rspa.1907.0051].
  - [65] U. Fano, "The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves)," *J. Opt. Soc. Am.* **31**, 213–222 (1941) [doi:10.1364/JOSA.31.000213].
  - [66] R. H. Ritchie, "Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films," *Phys. Rev.* **106**, 874 (1957) [doi:10.1103/PhysRev.106.874].
  - [67] R. H. Ritchie, E. T. Arakawa, J. J. Cowan, and R. N. Hamm, "Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction," *Phys. Rev. Lett.* **21**, 1530 (1968) [doi:10.1103/PhysRevLett.21.1530].
  - [68] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Z. Physik* **216**, 398–410 (1968) [doi:10.1007/BF01391532].
  - [69] Kretschmann, E., "Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light," *Z. Naturforsch* **23A**, 2135–2136 (1968).
  - [70] T. Wang, E. Boer-Duchemin, Y. Zhang, G. Comtet, and G. Dujardin, "Excitation of propagating surface plasmons with a scanning tunnelling microscope," *Nanotechnology* **22**, 175201 (2011) [doi:10.1088/0957-4484/22/17/175201].
  - [71] P. Bharadwaj, A. Bouhelier, and L. Novotny, "Electrical Excitation of Surface Plasmons," *Phys. Rev. Lett.* **106**, 226802 (2011) [doi:10.1103/PhysRevLett.106.226802].
  - [72] B. Diaconescu, K. Pohl, L. Vattuone, L. Savio, P. Hofmann, V. M. Silkin, J. M.

- Pitarke, E. V. Chulkov, P. M. Echenique, et al., “Low-energy acoustic plasmons at metal surfaces,” *Nature* **448**, 57–59 (2007) [doi:10.1038/nature05975].
- [73] H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Springer (1988).
- [74] S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and applications*, Springer, New York (2007).
- [75] L. Novotny and B. Hecht, *Principles of nano-optics*, Cambridge University Press (2006).
- [76] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, and L. M. Liz-Marzán, “LSPR-based nanobiosensors,” *Nano Today* **4**, 244–251 (2009) [doi:10.1016/j.nantod.2009.04.001].
- [77] M. Cardona, “Fresnel Reflection and Surface Plasmons,” *Am. J. Phys.* **39**, 1277 (1971) [doi:10.1119/1.1976627].
- [78] H. Kogelnik, “2. Theory of dielectric waveguides,” in *Integrated Optics* **7**, pp. 13–81, Springer Berlin Heidelberg (1979).
- [79] A. D. Boardman, *Electromagnetic Surface Modes*, John Wiley & Sons Ltd (1982).
- [80] J. Homola, *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer, Berlin (2006).
- [81] J. R. Sambles, G. W. Bradbery, and F. Yang, “Optical excitation of surface plasmons: An introduction,” *Contemporary Physics* **32**, 173–183 (1991) [doi:10.1080/00107519108211048].
- [82] S. Park, G. Lee, S. H. Song, C. H. Oh, and P. S. Kim, “Resonant coupling of surface plasmons to radiation modes by use of dielectric gratings,” *Opt. Lett.* **28**, 1870–1872 (2003) [doi:10.1364/OL.28.001870].
- [83] R. Kashyap and G. Nemova, “Surface Plasmon Resonance-Based Fiber and Planar Waveguide Sensors,” *Journal of Sensors* **2009**, 1–9 (2009) [doi:10.1155/2009/645162].
- [84] A. Bouhelier and G. P. Wiederrecht, “Surface plasmon rainbow jets,” *Opt. Lett.* **30**, 884–886 (2005) [doi:10.1364/OL.30.000884].
- [85] H. Bielefeldt, L. Novotny, Y. Inouye, D. Pohl, and Hecht, “Local Excitation, Scattering, and Interference of Surface Plasmons,” *Physical Review Letters* **77**, 1889–1892 (1996) [doi:10.1103/PhysRevLett.77.1889].
- [86] W. L. Barnes, A. Dereux, and T. W. Ebbesen, “Surface plasmon subwavelength optics,” *Nature* **424**, 824–830 (2003) [doi:10.1038/nature01937].
- [87] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing,” *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267–297 (2007) [doi:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607].
- [88] H. J. Lezec, A. Degiron, E. Devaux, R. A. Linke, L. Martin-Moreno, F. J. Garcia-Vidal, and T. W. Ebbesen, “Beaming Light from a Subwavelength Aperture,” *Science* **297**, 820–822 (2002) [doi:10.1126/science.1071895].
- [89] R. Schasfoort and A. Tudos, Eds., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Publishing (2008).
- [90] J. M. McDonnell, “Surface plasmon resonance: towards an understanding of the

- mechanisms of biological molecular recognition,” *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 572–577 (2001) [doi:16/S1367-5931(00)00251-9].
- [91] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing,” *Sensors and Actuators* **4**, 299–304 (1983) [doi:10.1016/0250-6874(83)85036-7].
- [92] W. H. Weber, “Modulated Surface-Plasmon Resonance for In Situ Metal-Film Surface Studies,” *Phys. Rev. Lett.* **39**, 153 (1977) [doi:10.1103/PhysRevLett.39.153].
- [93] D. Hornauer, H. Kapitza, and H. Raether, “The dispersion relation of surface plasmons on rough surfaces,” *J. Phys. D: Appl. Phys.* **7**, L100–L102 (1974) [doi:10.1088/0022-3727/7/9/102].
- [94] J. G. Gordon II and S. Ernst, “Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface,” *Surface Science* **101**, 499–506 (1980) [doi:16/0039-6028(80)90644-5].
- [95] C. Nylander, B. Liedberg, and T. Lind, “Gas detection by means of surface plasmon resonance,” *Sensors and Actuators* **3**, 79–88 (1982) [doi:10.1016/0250-6874(82)80008-5].
- [96] C. Hu and D. Liu, “High-performance Grating Coupled Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Al-Au Bimetallic Layer,” *Modern Applied Science* **4**, P8 (2010).
- [97] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, “Surface plasmon resonance sensors: review,” *Sensors and Actuators B: Chemical* **54**, 3–15 (1999) [doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9].
- [98] A. W. Snyder and J. D. Love, *Optical waveguide theory*, Springer (1983).
- [99] L.-C. Kao, “Improving the sensitivity of biosensor by use of the Ag and SiO<sub>2</sub>,” 2005, 60370W–60370W-8, SPIE [doi:10.1117/12.637735].
- [100] M. Yao, O.-K. Tan, S.-C. Tjin, and J. C. Wolfe, “Effects of intermediate dielectric films on multilayer surface plasmon resonance behavior,” *Acta Biomater* **4**, 2016–2027 (2008) [doi:10.1016/j.actbio.2008.06.002].
- [101] T. T. Ehler and L. J. Noe, “Surface Plasmon Studies of Thin Silver/Gold Bimetallic Films,” *Langmuir* **11**, 4177–4179 (1995) [doi:10.1021/la00010a088].
- [102] L. Wang, Y. Sun, J. Wang, X. Zhu, F. Jia, Y. Cao, X. Wang, H. Zhang, and D. Song, “Sensitivity enhancement of SPR biosensor with silver mirror reaction on the Ag/Au film,” *Talanta* **78**, 265–269 (2009) [doi:10.1016/j.talanta.2008.11.019].
- [103] R. G. Nuzzo and D. L. Allara, “Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces,” *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481–4483 (1983) [doi:10.1021/ja00351a063].
- [104] C. D. Bain and G. M. Whitesides, “Molecular-Level Control over Surface Order in Self-Assembled Monolayer Films of Thiols on Gold,” *Science* **240**, 62–63 (1988) [doi:10.1126/science.240.4848.62].
- [105] D. Jiang, J. Tang, B. Liu, P. Yang, X. Shen, and J. Kong, “Covalently coupling the antibody on an amine-self-assembled gold surface to probe hyaluronan-binding protein with capacitance measurement,” *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 1183–1191 (2003) [doi:10.1016/S0956-5663(02)00253-1].

- [106] E. Ostuni, L. Yan, and G. M. Whitesides, “The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **15**, 3–30 (1999) [doi:10.1016/S0927-7765(99)00004-1].
- [107] M. Piliarik and J. Homola, “Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?,” *Opt. Express* **17**, 16505–16517 (2009) [doi:10.1364/OE.17.016505].
- [108] A. V. Krasavin and N. I. Zheludev, “Active plasmonics: Controlling signals in Au/Ga waveguide using nanoscale structural transformations,” *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1416 (2004) [doi:10.1063/1.1650904].
- [109] T. Nikolajsen, K. Leosson, and S. I. Bozhevolnyi, “Surface plasmon polariton based modulators and switches operating at telecom wavelengths,” *Appl. Phys. Lett.* **85**, 5833 (2004) [doi:10.1063/1.1835997].
- [110] M. J. Dicken, L. A. Sweatlock, D. Pacifici, H. J. Lezec, K. Bhattacharya, and H. A. Atwater, “Electrooptic Modulation in Thin Film Barium Titanate Plasmonic Interferometers,” *Nano Letters* **8**, 4048–4052 (2008) [doi:10.1021/nl802981q].
- [111] D. Pacifici, H. J. Lezec, and H. A. Atwater, “All-optical modulation by plasmonic excitation of CdSe quantum dots,” *Nat Photon* **1**, 402–406 (2007) [doi:10.1038/nphoton.2007.95].
- [112] R. A. Pala, K. T. Shimizu, N. A. Melosh, and M. L. Brongersma, “A Nonvolatile Plasmonic Switch Employing Photochromic Molecules,” *Nano Letters* **8**, 1506–1510 (2008) [doi:10.1021/nl0808839].
- [113] K. F. MacDonald, Z. L. Samson, M. I. Stockman, and N. I. Zheludev, “Ultrafast active plasmonics,” *Nat Photon* **3**, 55–58 (2009) [doi:10.1038/nphoton.2008.249].
- [114] V. V. Temnov, G. Armelles, U. Woggon, D. Guzatov, A. Cebollada, A. Garcia-Martin, J.-M. Garcia-Martin, T. Thomay, A. Leitenstorfer, et al., “Active magneto-plasmonics in hybrid metal–ferromagnet structures,” *Nature Photon* **4**, 107–111 (2010) [doi:10.1038/nphoton.2009.265].
- [115] Y. M. Strelniker and D. J. Bergman, “Optical transmission through metal films with a subwavelength hole array in the presence of a magnetic field,” *Phys. Rev. B* **59**, R12763 (1999) [doi:10.1103/PhysRevB.59.R12763].
- [116] G. A. Wurtz, W. Hendren, R. Pollard, R. Atkinson, L. L. Guyader, A. Kirilyuk, T. Rasing, I. I. Smolyaninov, and A. V. Zayats, “Controlling optical transmission through magneto-plasmonic crystals with an external magnetic field,” *New J. Phys.* **10**, 105012 (2008) [doi:10.1088/1367-2630/10/10/105012].
- [117] Y.-C. Lan, Y.-C. Chang, and P.-H. Lee, “Manipulation of tunneling frequencies using magnetic fields for resonant tunneling effects of surface plasmons,” *Appl. Phys. Lett.* **90**, 171114 (2007) [doi:10.1063/1.2732827].
- [118] K. J. Chau, S. E. Irvine, and A. Y. Elezzabi, “A gigahertz surface magneto-plasmon optical modulator,” *Quantum Electronics, IEEE Journal of* **40**, 571–579 (2004) [doi:10.1109/JQE.2004.826422].
- [119] J. B. Khurgin, “Optical isolating action in surface plasmon polaritons,” *Appl. Phys. Lett.* **89**, 251115 (2006) [doi:10.1063/1.2422885].
- [120] B. Sepúlveda Martínez, G. Armelles Reig, L. M. Lechuga, and A. Calle Martín,

- “Device and method for detecting changes in the refractive index of a dielectric medium,” U.S. Patent No. WO/2005/121754, p. 35 (2004).
- [121] Z. Salamon, H. A. Macleod, and G. Tollin, “Coupled plasmon-waveguide resonators: a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties,” *Biophysical Journal* **73**, 2791–2797 (1997) [doi:10.1016/S0006-3495(97)78308-5].
  - [122] F.-C. Chien and S.-J. Chen, “A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes,” *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 633–642 (2004) [doi:10.1016/j.bios.2004.03.014].
  - [123] R. Micheletto, K. Hamamoto, T. Fujii, and Y. Kawakami, “Tenfold improved sensitivity using high refractive-index substrates for surface plasmon sensing,” *Appl. Phys. Lett.* **93**, 174104 (2008) [doi:10.1063/1.3005584].
  - [124] S. Ekgasit, C. Thammacharoen, F. Yu, and W. Knoll, “Influence of the Metal Film Thickness on the Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Biosensors,” *Appl Spectrosc* **59**, 661–667 (2005) [doi:10.1366/0003702053945994].
  - [125] M. Manesse, R. Sanjines, V. Stambouli, C. Jorel, B. Pelissier, M. Pisarek, R. Boukherroub, and S. Szunerits, “Preparation and Characterization of Silver Substrates Coated with Antimony-Doped SnO<sub>2</sub> Thin Films for Surface Plasmon Resonance Studies,” *Langmuir* **25**, 8036–8041 (2009) [doi:10.1021/la900502y].
  - [126] A. K. Mahapatro, A. Scott, A. Manning, and D. B. Janes, “Gold surface with sub-nm roughness realized by evaporation on a molecular adhesion monolayer,” *Applied Physics Letters* **88**, 151917 (2006) [doi:10.1063/1.2183820].
  - [127] A. V. Kabashin, P. Evans, S. Pastkovsky, W. Hendren, G. A. Wurtz, R. Atkinson, R. Pollard, V. A. Podolskiy, and A. V. Zayats, “Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing,” *Nat Mater* **8**, 867–871 (2009) [doi:10.1038/nmat2546].
  - [128] P. R. West, S. Ishii, G. V. Naik, N. K. Emani, V. M. Shalaev, and A. Boltasseva, “Searching for better plasmonic materials,” *Laser & Photonics Reviews* **4**, 795–808 (2010) [doi:10.1002/lpor.200900055].
  - [129] P. Debackere, S. Scheerlinck, P. Bienstman, and R. Baets, “Surface plasmon interferometer in silicon-on-insulator: novel concept for an integrated biosensor,” *Opt. Express* **14**, 7063–7072 (2006) [doi:10.1364/OE.14.007063].
  - [130] P. Debackere, R. Baets, and P. Bienstman, “Bulk sensing experiments using a surface-plasmon interferometer,” *Opt. Lett.* **34**, 2858–2860 (2009) [doi:10.1364/OL.34.002858].
  - [131] Q. Gan, Y. Gao, and F. J. Bartoli, “Vertical Plasmonic Mach-Zehnder interferometer for sensitive optical sensing,” *Opt. Express* **17**, 20747–20755 (2009) [doi:10.1364/OE.17.020747].
  - [132] S. Y. Wu, H. P. Ho, W. C. Law, C. Lin, and S. K. Kong, “Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach-Zehnder configuration,” *Opt. Lett.* **29**, 2378–2380 (2004) [doi:10.1364/OL.29.002378].
  - [133] J.-Y. Lee, T.-K. Chou, and H.-C. Shih, “Polarization-interferometric surface-plasmon-resonance imaging system,” *Opt. Lett.* **33**, 434–436 (2008) [doi:10.1364/OL.33.000434].

- [134] S. P. Ng, C. M. L. Wu, S. Y. Wu, and H. P. Ho, "White-light spectral interferometry for surface plasmon resonance sensing applications," *Opt. Express* **19**, 4521–4527 (2011) [doi:10.1364/OE.19.004521].
- [135] C. E. H. Berger and J. Greve, "Differential SPR immunosensing," *Sensors and Actuators B: Chemical* **63**, 103–108 (2000) [doi:10.1016/S0925-4005(00)00307-5].
- [136] S. Patskovsky, M. Maisonneuve, M. Meunier, and A. V. Kabashin, "Mechanical modulation method for ultrasensitive phase measurements in photonics biosensing," *Opt. Express* **16**, 21305–21314 (2008) [doi:10.1364/OE.16.021305].
- [137] Y.-B. Shin, H. M. Kim, Y. Jung, and B. H. Chung, "A new palm-sized surface plasmon resonance (SPR) biosensor based on modulation of a light source by a rotating mirror," *Sensors and Actuators B: Chemical* **150**, 1–6 (2010) [doi:10.1016/j.snb.2010.08.006].
- [138] P. P. Markowicz, W. C. Law, A. Baev, P. N. Prasad, S. Patskovsky, and A. Kabashin, "Phase-sensitive time-modulated surface plasmon resonance polarimetry for wide dynamic range biosensing," *Opt. Express* **15**, 1745–1754 (2007) [doi:10.1364/OE.15.001745].
- [139] Y.-C. Li, Y.-F. Chang, L.-C. Su, and C. Chou, "Differential-Phase Surface Plasmon Resonance Biosensor," *Analytical Chemistry* **80**, 5590–5595 (2008) [doi:10.1021/ac800598c].
- [140] B. Sepúlveda, A. Calle, L. M. Lechuga, and G. Armelles, "Highly sensitive detection of biomolecules with the magneto-optic surface-plasmon-resonance sensor," *Opt. Lett.* **31**, 1085–1087 (2006) [doi:10.1364/OL.31.001085].
- [141] M. Faraday, "Experimental Researches in Electricity. Nineteenth Series," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **136**, 1–20 (1846) [doi:10.1098/rstl.1846.0001].
- [142] Kerr, J., "On Rotation of the Plane of Polarization by Reflection From the Pole of a Magnet," *Philosophical Magazine* **3**, 321–343 (1877).
- [143] J. J. Brion, R. F. Wallis, A. Hartstein, and E. Burstein, "Theory of Surface Magnetoplasmons in Semiconductors," *Phys. Rev. Lett.* **28**, 1455 (1972) [doi:10.1103/PhysRevLett.28.1455].
- [144] K. W. Chiu and J. J. Quinn, "Magnetoplasma Surface Waves in Metals," *Phys. Rev. B* **5**, 4707 (1972) [doi:10.1103/PhysRevB.5.4707].
- [145] P. E. Ferguson, O.M. Stafsudd, and R.F. Wallis, "Enhancement of the transverse kerr magneto-optic effect by surface magnetoplasma waves," *Physica* **89B**, 91–94 (1977).
- [146] N. Richard, A. Dereux, T. David, E. Bourillot, J. P. Goudonnet, F. Scheurer, E. Beaurepaire, and G. Garreau, "Magneto-optical effects in multilayers illuminated by total internal reflection," *Phys. Rev. B* **59**, 5936 (1999) [doi:10.1103/PhysRevB.59.5936].
- [147] C. Hermann, V. A. Kosobukin, G. Lampel, J. Peretti, V. I. Safarov, and P. Bertrand, "Surface-enhanced magneto-optics in metallic multilayer films," *Phys. Rev. B* **64**, 235422 (2001) [doi:10.1103/PhysRevB.64.235422].
- [148] C. Uberoi and U. J. Rao, "Magnetoplasmon-type surface polaritons at the interface



- between two semiconductors,” *Surface Science* **66**, 210–220 (1977) [doi:10.1016/0039-6028(77)90408-3].
- [149] R. D. Olney, R. J. Romagnoli, and P. E. Ferguson, “Optical and magneto-optical effects of surface plasma waves with damping in iron thin films,” *J. Opt. Soc. Am. B* **3**, 1526–1528 (1986) [doi:10.1364/JOSAB.3.001526].
- [150] H. Feil and C. Haas, “Magneto-Optical Kerr Effect, Enhanced by the Plasma Resonance of Charge Carriers,” *Phys. Rev. Lett.* **58**, 65–68 (1987) [doi:10.1103/PhysRevLett.58.65].
- [151] M. S. Kushwaha and P. Halevi, “Magnetoplasmons in thin films in the Voigt configuration,” *Phys. Rev. B* **36**, 5960 (1987) [doi:10.1103/PhysRevB.36.5960].
- [152] W. A. McGahan, L.-Y. Chen, Z. S. Shan, D. J. Sellmyer, and J. A. Woollam, “Enhanced magneto-optic Kerr effects in thin magnetic/metallic layered structures,” *Appl. Phys. Lett.* **55**, 2479 (1989) [doi:10.1063/1.102004].
- [153] S. Visnovsky, M. Nyvlt, V. Prosser, J. Ferré, G. Pénissard, D. Renard, and G. Sczigel, “Magneto-optical effects in Au/Co/Au ultrathin film sandwiches,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **128**, 179–189 (1993) [doi:10.1016/0304-8853(93)90874-2].
- [154] V. I. Safarov, V. A. Kosobukin, C. Hermann, G. Lampel, J. Peretti, and C. Marlière, “Magneto-optical Effects Enhanced by Surface Plasmons in Metallic Multilayer Films,” *Phys. Rev. Lett.* **73**, 3584 (1994) [doi:10.1103/PhysRevLett.73.3584].
- [155] R. Atkinson and P. M. Dodd, “Optical and magneto-optical properties of sputter-deposited Co/Cu multilayers,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **173**, 202–214 (1997) [doi:10.1016/S0304-8853(97)00186-8].
- [156] R. Krishnan, M. Nyvlt, and S. Visnovsky, “Magneto-optic multilayers: Fundamental and technological aspects,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **175**, 90–98 (1997) [doi:10.1016/S0304-8853(97)00152-2].
- [157] V. Kochergin, A. Toporov, and M. Valeiko, “Polariton enhancement of the Faraday magnetooptic effect,” *JETP Letters* **68**, 400–403 (1998) [doi:10.1134/1.567880].
- [158] S. Visnovský, R. Lopusník, M. Nývlt, A. Das, R. Krishnan, M. Tessier, Z. Frait, P. Aitchison, and J. N. Chapman, “Magneto-optic studies of Fe/Au multilayers,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **198-199**, 480–482 (1999) [doi:10.1016/S0304-8853(98)01150-0].
- [159] J. Hamrle, M. Nývlt, Š. Višňovský, R. Urban, P. Beauvillain, R. Me'gy, J. Ferre', L. Polerecky, and D. Renard, “Magneto-optical properties of ferromagnetic/nonferromagnetic interfaces: Application to Co/Au(111),” *Phys. Rev. B* **64**, 155405 (2001) [doi:10.1103/PhysRevB.64.155405].
- [160] M. S. Kushwaha, “Plasmons and magnetoplasmons in semiconductor heterostructures,” *Surface Science Reports* **41**, 1–416 (2001) [doi:10.1016/S0167-5729(00)00007-8].
- [161] N. Bonod, R. Reinisch, E. Popov, and M. Nevière, “Optimization of surface-plasmon-enhanced magneto-optical effects,” *J. Opt. Soc. Am. B* **21**, 791–797 (2004) [doi:10.1364/JOSAB.21.000791].

- [162] B. Sepúlveda, L. M. Lechuga, and G. Armelles, “Magneto-optic Effects in Surface-Plasmon-Polaritons Slab Waveguides,” *Journal of Lightwave Technology* **24**, 945 (2006).
- [163] B. Sepúlveda, J. B. González-Díaz, A. García-Martín, L. M. Lechuga, and G. Armelles, “Plasmon-Induced Magneto-Optical Activity in Nanosized Gold Disks,” *Phys. Rev. Lett.* **104**, 147401 (2010) [doi:10.1103/PhysRevLett.104.147401].
- [164] L. Uba, A. Polewko, S. Uba, R. Gontarz, A. N. Yaresko, and V. N. Antonov, “Determination of the interfacial magneto-optical properties in sputtered Fe/Au multilayer structures,” *physica status solidi (a)* **196**, 145–148 (2003) [doi:10.1002/pssa.200306428].
- [165] L. G. C. Melo, A. D. Santos, L. M. Alvarez-Prado, and Y. Souche, “Optimization of the TMOKE response using the ATR configuration,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **310**, e947–e949 (2007) [doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.998].
- [166] B. Ran and S. G. Lipson, “Comparison between sensitivities of phase and intensity detection in surface plasmon resonance,” *Opt. Express* **14**, 5641–5650 (2006) [doi:10.1364/OE.14.005641].
- [167] A. V. Kabashin, S. Patskovsky, and A. N. Grigorenko, “Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing,” *Opt. Express* **17**, 21191–21204 (2009) [doi:10.1364/OE.17.021191].
- [168] M. J. Weber, *Handbook of lasers*, CRC Press (2001).
- [169] G. Morthier, *Handbook of Distributed Feedback Laser Diodes*, Artech House Publishers (1997).
- [170] E. Ferreira-Vila, J. B. Gonzalez-Diaz, R. Fermento, M. U. Gonzalez, A. Garcia-Martin, J. M. Garcia-Martin, A. Cebollada, G. Armelles, D. Meneses-Rodriguez, et al., “Intertwined magneto-optical and plasmonic effects in Ag/Co/Ag layered structures,” *Phys. Rev. B* **80**, 125132–125139 (2009) [doi:10.1103/PhysRevB.80.125132].
- [171] E. Ferreira-Vila, M. Iglesias, E. Paz, F. J. Palomares, F. Cebollada, J. M. González, G. Armelles, J. M. García-Martín, and A. Cebollada, “Magneto-optical and magnetoplasmonic properties of epitaxial and polycrystalline Au/Fe/Au trilayers,” *Phys. Rev. B* **83**, 205120 (2011) [doi:10.1103/PhysRevB.83.205120].
- [172] P. B. Johnson and R. W. Christy, “Optical Constants of the Noble Metals,” *Phys. Rev. B* **6**, 4370 (1972) [doi:10.1103/PhysRevB.6.4370].
- [173] E. D. Palik, *Handbook of Optical Constants of Solids, Five-Volume Set: Handbook of Optical Constants of Solids, Volume 3*, 1st ed., E. D. Palik, Ed., Academic Press (1997).
- [174] Y. P. Lee, Y. V. Kudryavtsev, V. V. Nemoshkalenko, R. Gontarz, and J. Y. Rhee, “Magneto-optical and optical properties of Fe-rich Au-Fe alloy films near the fcc-bcc structural transformation region,” *Phys. Rev. B* **67**, 104424 (2003) [doi:10.1103/PhysRevB.67.104424].
- [175] M. Schubert, “Polarization-dependent optical parameters of arbitrarily anisotropic homogeneous layered systems,” *Phys. Rev. B* **53**, 4265 (1996) [doi:10.1103/PhysRevB.53.4265].